



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ

ΜΕ ΤΑ ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

***In vitro* έλεγχος επίδρασης αιθέριων ελαίων ενάντια στις μυκητιάσεις των
θαλασσινών ψαριών από *Exophiala spp.***

Τζιμούρτος Ι. Αντώνιος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Επιβλέπων: Αθανασοπούλου Φωτεινή, Καθηγήτρια Π.Θ.**
- 2. Παππάς Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Π.Θ.**
- 3. Κολύγας Μάρκος, Ερευνητής**

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF VETERINARY SCIENCE

**MASTER THESIS GRADUATE PROGRAM OF THE DEPARTMENT OF VETERINARY
SCIENCE IN PARTNERSHIP WITH THE TEI OF EPIRUS**

***In vitro* control of the effect of essential oils against marine fish fungus by
*Exophiala spp.***

Tzimourtos I. Antonios

TRIMELIS ADVISORY COMMITTEE

- 1. Supervisor: Athanasopoulou Foteini, Professor of UNIVERSITY of Thessaly**
- 2. Pappas Ioannis, Associate Professor of UNIVERSITY of Thessaly**
- 3. Kolygas Marcos, Researcher**

KARDITSA 2017

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αρωματικά φυτά - βότανα είχαν μία ιδιαίτερη θέση σε όλους τους αρχαίους λαούς. Πάντα θεωρήθηκαν σαν η έκφραση της γενναιοδωρίας της φύσης καθώς και η έκφραση της ομορφιάς. Η αναγνώριση της θεραπευτικής αξίας των φυτών δεν συναντάται μόνο στην Ελλάδα. Οι Κινέζοι, οι Σουμέριοι, οι Βαβυλώνιοι, οι Αιγύπτιοι, αναγνώριζαν επίσης την αξία τους. Επιπλέον, τα χρησιμοποιούσαν στη μαγειρική, στην αρωματοθεραπεία, στη βαφική καθώς επίσης, και σε θρησκευτικές τελετές από ορισμένους λαούς.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να αναδειχτεί η χρήση των αιθέριων ελαίων ως φυσικό φάρμακο έναντι στο μυκητιακό στέλεχος που ανήκει στο γένος *Exophiala* sp. Δεδομένου του μικρού αριθμού των διαθέσιμων και επιτρεπόμενων εξ' αυτών αντιμυκητιακών φαρμάκων για χρήση σε ψάρια, οδηγούμαστε σε φυσική λύση του προβλήματος. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύγονται τα κατάλοιπα των φαρμάκων στη σάρκα τόσο των ψαριών όσο στους ανθρώπους ως τελικοί καταναλωτές.

Η παρούσα έρευνα εξετάζει σε εργαστηριακές συνθήκες την πιθανή χρήση επτά αιθέριων ελαίων (*Eucalyptus globulus*, *Malaleuca alternifolia*, *Ocimum basilicum*, *Origanum majorana*, *Pogostemon cablin*, *Rosmarinus officinalis* και *Thymus vulgaris*) έναντι ενός είδους *Exophiala* που περιγράφηκε προηγουμένως ως παθογόνο σε καλλιεργημένο φαγγρί (*Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758) στην Ελλάδα.

Διαφορετικές συγκεντρώσεις (100-200-400-800 και 1600μg / ml) των παραπάνω αιθέριων ελαίων αραιώθηκαν σε PDA (άγαρ δεξτρόζης πατάτας) σε τρυβλία Petri. Μετά τον εμβολιασμό και την περίοδο επώασης 6 εβδομάδων στους 220 ° C καταγράφηκε η διάμετρος των αποικιών. Το αιθέριο έλαιο *Thymus vulgaris* έχει ισχυρή αντιμυκητιασική ($\geq 400\mu\text{g} / \text{ml}$) και λεύκανση ($\leq 400\mu\text{g} / \text{ml}$) κατά της μυκηλιακής ανάπτυξης και της βλάστησης των κονιδίων του *Exophiala* sp. Αντίθετα, το *Eucalyptus globulus* (100μg / ml), το *Origanum majorana* (200μg / ml) και το *Rosmarinus officinalis* (100μg / ml) όχι μόνο ανέστειλαν την ακτινική ανάπτυξη του μύκητα, αλλά επίσης το επέκτειναν με στατιστική σημασία.

Λέξεις-κλειδιά: Μαύρες ζύμες, *Exophiala* sp., Θαλάσσιοι μύκητες, αιθέρια έλαια

ABSTRACT

Herbs - herbs have a special place in all the ancient peoples. They have always been seen as the expression of the generosity of nature as well as the expression of beauty. The recognition of the healing value of plants is not only found in Greece. The Chinese, the Sumerians, the Babylonians, the Egyptians, also recognized their value. In addition, they used them in cooking, aromatherapy, dyeing as well as in religious ceremonies by some peoples.

The purpose of this paper is to demonstrate the use of essential oils as a natural drug against the fungal strain belonging to the genus *Exophiala* sp. Given the small number of available and permitted antifungal medicines for use in fish, we are leading to a natural solution to the problem. This avoids the residues of drugs in the flesh of both fish and humans as final consumers.

The present research investigates *in vitro*, the potential use of seven (7) essential oils (*Eucalyptus globulus*, *Malaleuca alternifolia*, *Ocimum basilicum*, *Origanum majorana*, *Pogostemon cablin*, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*) against an *Exophiala* species previously described as pathogen in cultured *red porgy* (*Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758) in Greece.

Different concentrations (100-200-400-800 and 1600µg/ml) of the above essential oils were diluted in PDA (Potato Dextrose Agar) in Petri dishes. After inoculation and 6 week incubation period at 22°C, the diameter of the colonies was recorded. *Thymus vulgaris* essential oil showed a strong antifungal ($\geq 400\mu\text{g/ml}$) and bleaching activity ($\leq 400\mu\text{g/ml}$) against mycelial growth and conidia germination of *Exophiala* sp. On the contrary, *Eucalyptus globulus* (100µg/ml), *Origanum majorana* (200µg/ml) and *Rosmarinus officinalis* (100µg/ml) not only failed to inhibit the radial growth of the fungus, but broadened it with statistical significance.

Keywords: Black Yeast, *Exophiala* sp., marine fungi, essential oils

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επόπτρια καθηγήτρια μου Δρ. Φωτεινή Αθανασοπούλου για την βοήθεια, την καθοδήγηση, την εποπτεία και την τελική επιμέλεια της παρούσας έρευνας.

Ευχαριστώ τον Δρ. Μάρκο Κολύγα για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την οργάνωση των γραφημάτων της παρούσας έρευνας καθώς επίσης, για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και την καθοδήγηση του.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1^ο	9
Ιστορική αναδρομή των αιθέριων ελαίων	9
1.1. Εισαγωγή	9
1.2. Τα αρωματικά φυτά.....	9
1.3. Η σύσταση των σημαντικότερων φυσικών προϊόντων.....	10
1.4. Η χρήση των αρωματικών φυτών ως φυσικών φαρμάκων στους αρχαίους λαούς.....	12
1.5. Η χρήση των αρωματικών φυτών στη μαγειρική τέχνη.....	18
1.6. Ορολογία.....	19
1.7. Τα αρωματικά φυτά στη σύγχρονη Ελλάδα.....	20
Κεφάλαιο 2^ο	23
Αναλυτική παρουσίαση των επτά αιθέριων ελαίων του πειράματος	23
2.1. Γενικά μορφολογικά γνωρίσματα της οικογένειας <i>Lamiaceae</i>	23
2.1.1. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Origanum majorana</i> Linnaeus 1753 (Μαντζουράνα).....	25
2.1.2. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Pogostemon cablin</i> Benth 1848 (Πατσουλί).....	27
2.1.3. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Rosmarinus officinalis</i> Linnaeus 1753 (Δενδρολίβανο).....	29
2.1.4. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Thymus vulgaris</i> Linnaeus 1753 (Θυμάρι).....	31
2.1.5. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Ocimum basilicum</i> Linnaeus 1753 (Βασιλικός).....	32
2.2. Γενικά μορφολογικά γνωρίσματα της οικογένειας <i>Myrtaceae</i>	33
2.2.1. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Malaleuca alternifolia</i> Maiden & Betche, 1905 (Τεϊόδεντρο).....	35
2.2.2. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Eucalyptus globulus</i> Labillardiere 1804 (Ευκάλυπτος).....	37
Κεφάλαιο 3^ο	39
Ανθρώπινες ασθένειες που οφείλονται σε <i>Exophiala spp.</i>	39
3.1. Γνωριμία το γένος του μύκητα <i>Exophiala</i>	39
3.2. Το γένος <i>Exophiala</i> ως αιτία φαιοφυομυκητίασης στον άνθρωπο.....	41
3.3. Πρόκληση μαδούριου πούς λόγω του μύκητα <i>Exophiala jeanselmei</i>	43

3.4. Μυκητιασική μελανονυχία λόγω <i>Exophiala dermatitidis</i>	44
Κεφάλαιο 4°	46
Ασθένειες ιχθύων που οφείλονται στο γένος του μύκητα <i>Exophiala</i> spp.....	46
4.1. Υδατοφόρα είδη <i>Exophiala</i> που προκαλούν ασθένεια σε ψυχρόαιμα ζώα.....	46
4.2. Μυκητιάσεις σε Ιχθύες.....	47
4.2.1. Μυκητιάσεις σε θαλασσινά εκτρεφόμενα ψάρια από <i>Exophiala angulospora</i>	48
4.2.2. Μυκητιάσεις σε σολομό του Ατλαντικού από <i>Exophiala salmonis</i> και <i>Exophiala psychrophila</i>	49
4.2.3. Εμφάνιση του <i>Exophiala xenobiotica</i> σε εκτρεφόμενα και μη ψάρια.....	51
4.2.4. <i>Exophiala pisciphila</i> σε καταστάσεις αιχμαλωσίας σε ενυδρεία.....	53
4.3. Μυκητιακή μόλυνση από <i>Exophiala werneckii</i> σε παστωμένα ψάρια.....	56
Κεφάλαιο 5°	57
Πειραματικό μέρος.....	57
5.1. Υλικά και μεθοδολογία	57
5.2. Αποτελέσματα.....	61
5.3. Συζήτηση.....	70
5.4 Τελικά συμπεράσματα.....	71
Βιβλιογραφία.....	73

Κεφάλαιο 1^ο

Ιστορική αναδρομή των αιθέριων ελαίων

1.1. Εισαγωγή

Τα φυσικά προϊόντα είναι τα προϊόντα τα οποία προέρχονται από τη φύση και ως επί το πλείστον είναι φυτικής προέλευσης. Τα φυτικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια είναι τα σημαντικότερα φυσικά προϊόντα (Τσιουρή, 2015).

Η αυξημένη ανάγκη των ανθρώπων για ζήτηση φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών σε φυσικά προϊόντα, ως φυσική επιλογή, ωθεί τη βιομηχανία στην έρευνα των φυτών αυτών. Ωστόσο, στη παραγωγή του τελικού προϊόντος, συμβάλουν αρκετές επιστήμες όπως δασοκομίας, χημικές, τροφίμων, φαρμακευτικές κ.α.

Δυστυχώς, η βιομηχανία υστερεί σε ένα βαθμό ως προς την διερεύνηση της πραγματικής ασφάλειας αυτών των φυσικών προϊόντων. Για παράδειγμα, πολλά φυσικά προϊόντα προκαλούν αλλεργικές διαταραχές, ενώ τα αντίστοιχα συνθετικά τους όχι (Κατσίμπιρη, 2010).

1.2. Τα αρωματικά φυτά

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά αποτελούν κομμάτι της αρχαίας θεραπευτικής. Ιστορικά, η χρήση τους είναι γνωστό πως ξεκινάει από την περίοδο του πρωτόγονου ανθρώπου, που αναζητούσε στα φυτά, όχι μόνο την τροφή του, αλλά και τα φάρμακά του. Άλλωστε, οι αρχηγοί των φυλών συγκέντρωναν τα ιαματικά φυτά, τις χρήσιμες ιδιότητες των οποίων είχαν ανακαλύψει, ώστε να είναι σε θέση να εκτελούν και ιατρικά καθήκοντα ανάμεσα στις φατρίες. Στα φυτά στηρίχθηκαν ακόμη και οι μάγοι και

οι ιερείς, οι οποίοι καθιέρωσαν πολύ νωρίς τη θεραπεία των ασθενειών ως επάγγελμά τους (Λίγγα, 2000).

Τα αρωματικά - φαρμακευτικά φυτά, αποτελούν από μόνα τους μια μεγάλη κατηγορία του φυτικού βασιλείου και κατέχουν ξεχωριστή θέση ανάμεσα στους ανθρώπους παγκοσμίως κατά τη διάρκεια όλων των εποχών (Τσάτσα, 2004).

Αρωματικά φυτά ονομάζονται τα φυτά που περιέχουν αρωματικές ουσίες σε ένα ή σε όλα τους τα τμήματα, (άνθη, φύλλα, βλαστούς καρπούς, σπέρματα, ρίζες) και παράγουν αιθέρια έλαια (μίγματα διαφόρων οργανικών ενώσεων. Το χαρακτηριστικό άρωμα των φυτών αυτών οφείλεται στην παρουσία αιθέριων ελαίων, πτητικών ελαίων διαφορετικών από τα συνηθισμένα φυτικά έλαια (Φρατζεσκάκης, 2003, Τσουβαλάκη, 2009).

Τα αρωματικά φυτά καλλιεργούνται ή είναι αυτοφυή. Η συγκομιδή των αυτοφυών φυτών πρέπει να γίνεται κατά την περίοδο της άνθησης τους. Πρέπει να αποφεύγεται η εκρίζωση τους, να καθαρίζονται επιμελώς από το χώμα, από τμήματα άλλων ριζών καθώς επίσης, από έντομα και ακαθαρσίες. Τα αυτοφυή φυτά πρέπει να βρίσκονται σε σκιερό-αεριζόμενο μέρος (π.χ. υπόστεγα) συσκευασμένα σε χαρτοκιβώτια, σάκους ή πλαστικές σακούλες (Τσουβαλάκη, 2009).

1.3. Η σύσταση των σημαντικότερων φυσικών προϊόντων

Τα φυτικά εκχυλίσματα τα παραλαμβάνουμε από τις δρόγες των φυτών με τη χρήση κάποιου διαλύτη. Ενώ, τα αιθέρια ή πτητικά έλαια είναι πολυσύνθετα, αρωματικής οσμής, πτητικά μίγματα αρωματικής προέλευσης κυρίως, μονοτερπενίων και σεσκιτερπενίων (Τσιουρή, 2015, Μερτζανίδης, 2015).

Αποτελούνται από πτητικές ουσίες, πιο συγκεκριμένα δευτερογενής μεταβολίτες που απομονώνονται από αρωματικά φυτά συγκεκριμένων φυτικών ειδών με απόσταξη μέσω πίεσης ατμού, υδραπόσταξης ή ξηρής απόσταξης, ενώ η ποιοτική τους ανάλυση γίνεται με διάφορες μεθόδους και κυρίως με αέρια χρωματογραφία- φασματοσκοπία μάζας (Bakkali *et al.*, 2008). Σύμφωνα με τους Hargreaves *et al.*, (1975), αυτά παράγονται στους ειδικούς αδένες των αρωματικών φυτών και είναι διαλυτά στην αιθανόλη και λιγότερο διαλυτά στο νερό.

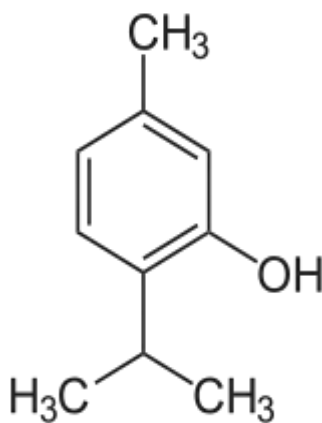
Τα αιθέρια έλαια είναι γνωστά για τις αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, αντιιικές και εντομοαπωθητικές τους ιδιότητες (Mari *et al.*, 2003, Bakkali *et al.*, 2008). Οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες οφείλονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών αυτών από τα οποία απομονώνονται. Τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού χρησιμοποιούνται από τα φυτά αυτά για την προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς και τα επιβλαβή έντομα.

Τα αιθέρια έλαια καθώς και οι ενώσεις που προέρχονται από αυτά, διαθέτουν ευρύ φάσμα δράσεων με την αντιμικροβιακή δράση τους ως τη πιο μελετημένη. Οι ισχυρές αντιμικροβιακές ενώσεις των αιθέριων ελαίων είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και ανήκουν στη κατηγορία των τερπενίων, όπως τα λιπόφιλα μονοτερπένια: θυμόλη, καρβακρόλη, λιναλοόλη, κιτράλη, γερανιόλη και 1,8- κινεόλη. Αποτελούν το 90% των αιθέριων ελαίων και εμφανίζουν μια μεγάλη ποικιλία δομών. Οι εφαρμογές των τερπενίων, έχουν μελετηθεί ως συντηρητικά σε τρόφιμα ή αντισηπτικά και απολυμαντικά (Τσιουρή, 2015).

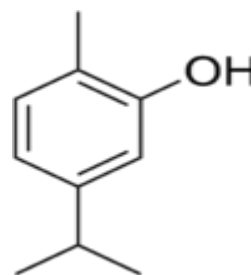
Παρακάτω βλέπουμε τους χημικούς τύπους των κυριότερων συστατικών των αιθέριων ελαίων. (Εικ. 1.3.1.)



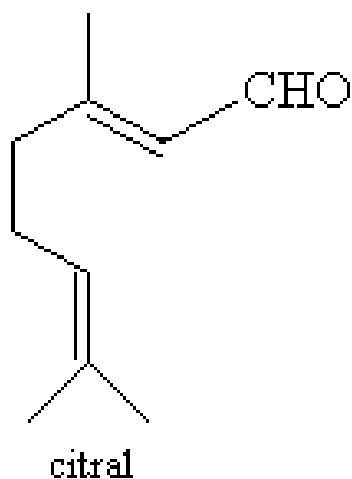
1,8- κινεόλη



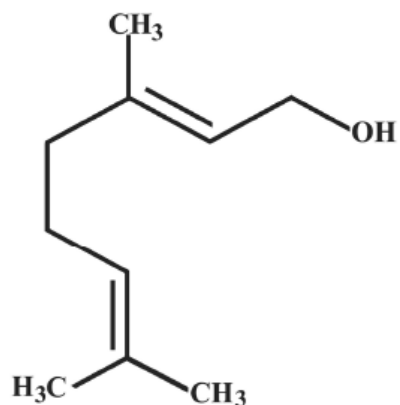
Θυμόλη



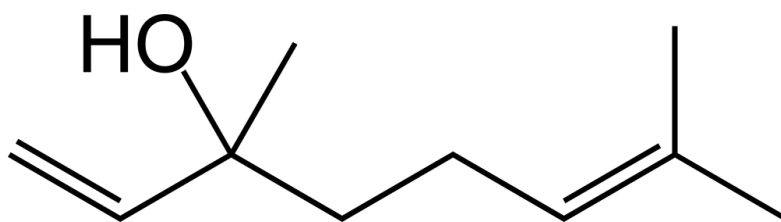
Καρβακρόλη



Κιτράλη



Γερανιόλη



Λιναλοόλη

Εικόνα 1.3.1.(Πηγή: <https://et.wikipedia.org>)

1.4. Η χρήση των αρωματικών φυτών ως φυσικών φαρμάκων στους αρχαίους λαούς

Τα αρωματικά φυτά - βότανα είχαν μία ιδιαίτερη θέση σε όλους τους αρχαίους λαούς. Πάντα θεωρήθηκαν σαν η έκφραση της γενναιοδωρίας της φύσης καθώς και η έκφραση της ομορφιάς. Και είναι γνωστό ότι, αν τα φυτά είναι παιδιά της Γης, είναι επίσης και παιδιά του Ουρανού, καθώς δέχονται επιδράσεις και από τον ήλιο.

Ο πατέρας της ιατρικής, Ιπποκράτης, είχε αναφερθεί αρκετά για τις θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών, ο οποίος γύρω στο 400 π.Χ. δίνει ένα κατάλογο με περισσότερα από

400 φάρμακα από βότανα και φαρμακευτικά φυτά, κάποια από τα οποία χρησιμοποιούνται και σήμερα (Φρατζεσκάκης, 2003, Τσάτσα, 2004). Επίσης, αναφέρει πως τα βότανα εκτός από τροφή μπορεί να γίνουν και φάρμακο «κάνε την τροφή φάρμακο σου και το φάρμακο τροφή σου» (Μαυροκουκουλάκη, 2013). Με το ίδιο θέμα ασχολήθηκαν και ο Θεόφραστος και ο Διοσκουρίδης αργότερα, όπου ο τελευταίος περιέγραψε τις θεραπευτικές ιδιότητες 600 περίπου φυτών. Σημαντική ήταν και η συμβολή του Παράκελσου, του μεγάλου αλχημιστή και γιατρού, για τη χρήση του μεγάλου φαρμακείου της φύσης. Η αναγνώριση της θεραπευτικής αξίας των φυτών δεν συναντάται μόνο στην Ελλάδα. Οι Κινέζοι, οι Σουμέριοι, οι Βαβυλώνιοι, οι Αιγύπτιοι, αναγνώριζαν επίσης την αξία τους (Σκρουμπής, 1988).

Οι Σουμέριοι και οι Ασσύριοι, (από τους αρχαιότερους λαούς του κόσμου), που ζούσαν στην Μεσοποταμία, γνώριζαν τις θεραπευτικές ιδιότητες 200 περίπου φυτών μεταξύ των οποίων ήταν και ο άνηθος, ο μάραθος, ο κρόκος, η ρίγανη, το θυμάρι κλπ. που τα χρησιμοποιούσαν οι γιατροί και οι μάγοι της εποχής.

Εικόνα 1.4.1. Κήποι που κρέμονται από τα πεζούλια παλατιών (Πηγή: <http://pointfromview.blogspot.gr>)



Στην αρχαία Βαβυλωνία, εκτός από τους κρεμαστούς κήπους στους οποίους καλλιεργούσαν πολλά διακοσμητικά φυτά (Εικ.1.4.1.), υπήρχαν κι άλλοι μεγάλοι κήποι με αρωματικά φυτά για παραγωγή αρτυμάτων που τα έσοδά τους αποτελούσαν ένα σημαντικό μέρος της οικονομίας τους.

Η αρχαία Αίγυπτος ήταν ένα σημαντικό κέντρο αρωματικών φυτών. Οι ίδιοι τα χρησιμοποιούσαν σε θρησκευτικές τελετές, για την μουμιοποίηση των νεκρών, για τις αρωματικές και θεραπευτικές τους ιδιότητες (Εικ. 1.4.2.), (Σκρουμπής, 1988). Στις πυραμίδες της Αιγύπτου βρέθηκαν ξηρά αρώματα. Στην αρχαία Αίγυπτο πάπυροι του 2800 π.Χ. αναφέρουν τη θεραπευτική χρήση ορισμένων βοτάνων όπως του σκόρδου, της μέντας, του αρκεύθου και της ματζουράνας (Τσουβαλάκη, 2009).



Εικόνα 1.4.2. Τελετουργικό μουμιοποίηση των νεκρών στην Αίγυπτο (Πηγή: <http://atlaswikigr.wikifoundry.com>)

Στην Παλαιά Διαθήκη υπάρχουν αναφορές κατά τις οποίες τα αρωματικά φυτά συγκαταλέγονται σε προϊόντα μεγάλης αξίας όπως ο χρυσός και οι πολύτιμοι λίθοι. Γενικά αποτελούσαν σημαντικό αντικείμενο του εμπορίου με οικονομικό όφελος (Σκρουμπής, 1988).

Στην αρχαία Ελλάδα τα αρωματικά φυτά έχουν επίσης μεγάλη σημασία και αξία. Τον 15^ο αιώνα π.Χ. στους πρώτους Ολυμπιακούς αγώνες στην Ελλάδα οι νικητές στεφανώνονταν με δάφνινα στεφάνια και πετροσέλινο (Εικ.1.4.3.). Στεφάνια έφτιαχναν και από μαϊντανό, δυόσμο και μάραθο. Ένα από τα πιο αγαπημένα φυτά των αρχαίων Ελλήνων υπήρξε η δάφνη του Απόλλωνα, που της απέδιδαν θεϊκές ιδιότητες (Φρατζεσκάκης, 2003, Τσάτσα, 2004).



Εικόνα 1.4.3. Στέψη του νικητή των Ολυμπιακών αγώνων με δάφνινο στεφάνι
(Πηγή: www.mixanitouxronou.gr)

Την εποχή της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, οι Ρωμαίοι μεταφέρουν με πλοία και εμπορεύονται μπαχαρικά από την Ινδία και την Αίγυπτο (Εικ.1.4.4.). Τα αρωματικά φυτά ήταν διαθέσιμα μόνο για τις «ελίτ» τάξεις των πλουσίων. Προσέδιδαν σ' αυτά τόση αξία όση και στο χρυσό. Ο Γαληνός, από το όνομα του οποίου πήραν την ονομασία τους τα «γαληνικά παρασκευάσματα», διατύπωσε συνταγές παρασκευής φαρμάκων, ενώ ο Πλίνιος περιέγραψε τις φαρμακευτικές ιδιότητες πολλών φυτών.



Εικόνα 1.4.4. Εμπόριο μπαχαρικών (Πηγή: <https://e-rodios.blogspot.gr>)

Κατά τη διάρκεια του μεσαίωνα, το εμπόριο μπαχαρικών και αρωματικών φυτών μειώθηκε. Τα χρόνια πριν την αναγέννηση ωστόσο, καθώς ο ευρωπαϊκός πολιτισμός άρχισε να αναπτύσσεται η ζήτηση για μπαχαρικά ήταν το κλειδί για την ανάπτυξη του διεθνούς εμπορίου. Πολλά από τα κυριότερα μπαχαρικά έρχονται από την Ινδία, την Κίνα και την Ινδονησία. Οι Ευρωπαίοι αναζητούσαν διαρκώς νέους κόσμους στην προσπάθειά τους να αποκτήσουν αποκλειστικότητα στο εμπόριο και νέους δρόμους για να φτάσουν ευκολότερα στην Ανατολή. Τα μπαχαρικά ήταν επίσης ένας από τους λόγους για τους οποίους ξεκίνησε η εξερεύνηση του κόσμου τον 15ο και 16ο αιώνα, και κατ' επέκταση ένα από τα αίτια της ανακάλυψης της Αμερικής. Στα τέλη του 13ου αιώνα, οι εξερευνητικές προσπάθειες του Μάρκο Πόλο καθιέρωσαν τη Βενετία ως το μεγαλύτερο κέντρο εμπορίου αρωματικών φυτών. Ο Πορτογάλος Βάσκο ντε Γκάμα έκανε τον περίπλου της Αφρικής από το Ακρωτήριο της Καλής Ελπίδας και έφτασε στην Ινδία. Επιστρέφοντας στην Πορτογαλία έφερε στους Πορτογάλους πιπέρι, κανέλα, αρμπαρόριζα και άλλα πολύτιμα προϊόντα, ενώ έκλεισε και πολλές εμπορικές συμφωνίες. Το 1492 ο Χριστόφορος Κολόμβος για λογαριασμό της Ισπανίας και ψάχνοντας να βρει άλλον δρόμο για τις Ινδίες, ανακάλυψε την Αμερική, που φυσικά ονόμασε τότε Δυτικές Ινδίες. Έφερε πίσω στην Ισπανία αρωματικό πιπέρι, βανίλια, καπνό και άλλα βότανα που για πρώτη φορά έβλεπαν οι Ευρωπαίοι (Τσιγαρίδα, 2007, Τζιμήκα, 2013).

Στην περίοδο της Αναγέννησης δίδεται νέα ώθηση στην εξέλιξη και στην πρόοδο του τομέα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Τα μεγάλης απόστασης ταξίδια στην Ανατολή και στην Αμερική μετέφεραν γόνιμα ρεύματα και παράλληλα αποτέλεσαν αστείρευτη πηγή πολύτιμων ανακαλύψεων. Σ' αυτή τη φάση, η Ευρώπη υπήρξε το κέντρο ενός διαρκώς επεκτεινόμενου παγκοσμίου εμπορίου, με συνέπεια την εισαγωγή νέων αντιλήψεων γύρω από τα αρωματικά φυτά. Πολλοί μελετητές ασχολούνται λεπτομερώς με τη μελέτη και την ανάλυση αυτών. Ο γιατρός Παράκελσος (1493-1541) έκανε πολύπλοκα πειράματα για να φτάσει στην «πηγή» της θεραπευτικής δύναμης των φυτών. Η πορεία, όμως, που είχε να διανύσει παρουσίαζε πολλά εμπόδια και ήταν πολύ μεγάλη, ώστε μόλις σήμερα και χάρη στην επιστήμη της χημείας, επιτεύχθηκε ο αρχικός στόχος.

Οι Αμερικανοί άρχισαν να ασχολούνται με το εμπόριο μπαχαρικών το 1672, όταν ο Elihu Yale, έχοντας εμπειρία από τη δουλειά του στην Εταιρεία Ανατολικών Ινδιών, ξεκίνησε επιχείρηση μπαχαρικών στη Βοστώνη. Έκανε τόσο μεγάλη περιουσία και αργότερα ίδρυσε Πανεπιστήμιο, το περίφημο Πανεπιστήμιο Yale. Σταδιακά οι

Αμερικανοί έμποροι απεξαρτήθηκαν από τα Ευρωπαϊκά μονοπώλια και ανέπτυξαν το εμπόριο και πολλών ιθαγενών ειδών (Τσιγαρίδα, 2007, Τζιμήκα, 2013).

Η περίοδος που ξεκινάει από το 1800 και φτάνει μέχρι τις μέρες μας, έρχεται να φέρει επαναστατικές θεωρίες και μεθόδους που ευνοούν τα αρωματικά φυτά, την καλλιέργεια, την επεξεργασία και την εμπορία τους. Κάποια στιγμή, βέβαια, η σημασία των αρωματικών φυτών και των παραγόμενων από αυτά ελαίων, καθώς και η χρήση όλων αυτών περιορίστηκε, λόγω της παρασκευής συνθετικών χημικών υλικών που μπορούσαν, εκ πρώτης όψεως, να υποκαταστήσουν τα αιθέρια έλαια και τις ουσίες που λαμβάνονται από τα αρωματικά φυτά, ειδικότερα αυτές που είχαν χρήση στη φαρμακευτική και όχι μόνο. Τώρα πια ξεκινάει ένας αγώνας συστηματικής εκμετάλλευσης αυτού του είδους των φυτών, λαμβάνοντας υπόψη όλες εκείνες τις προϋποθέσεις, που θα οδηγήσουν σ' ένα υγιή τρόπο αξιοποίησης του συγκεκριμένου τομέα. Οι παράμετροι που αφορούν την ευαισθητοποίηση της κοινής γνώμης, τον περιορισμό της χρήσης χημικών και συνθετικών ουσιών αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες στην ευρύτερη διάδοση της συγκεκριμένης κατηγορίας φυτών.

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια σημειώνεται τόσο στην Ευρώπη όσο και στη Βόρεια Αμερική μια «βοτανική αναγέννηση», καθώς όλο και περισσότεροι άνθρωποι δίνουν συνεχώς μεγαλύτερη βαρύτητα στην υγιεινή διατροφή, σε θεραπείες με φάρμακα που χρησιμοποιούν φυτικές ουσίες και σε καλλυντικά που ως πρώτη ύλη έχουν την κατηγορία των βοτάνων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στη δυτική Ευρώπη, η κατανάλωση φαρμακευτικών φυτών διπλασιάστηκε την τελευταία δεκαετία, ενώ η συστηματική μελέτη πολλών φυτών έχει δώσει πολλές νέες ουσίες και χρήσεις, όπως η αρωματοθεραπεία. Πρόκειται για μια μορφή θεραπευτικής με βάση τα διάφορα αιθέρια έλαια. Η διάδοσή της ξεκίνησε, κατά τη δεκαετία του 1930 όταν, με επιστημονικές έρευνες κυρίως Γάλλων χημικών, άρχισε και πάλι να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στις θεραπευτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των διαφόρων αιθέριων ελαίων. Τότε δόθηκε και το όνομα αρωματοθεραπεία και η χρήση της συνεχώς κερδίζει έδαφος, ιδιαίτερα για την καταπολέμηση του άγχους, για δερματικά και αναπνευστικά προβλήματα και προβλήματα μυϊκών πόνων και αρθριτικών.

Αποδεικτικό της ευρύτατης σημασίας που προσλαμβάνει η χρήση των αρωματικών φυτών είναι ότι πρόσφατα αναπτύχθηκε μια νέα δραστηριότητα που σχετίζεται με αυτά, ο αρωματουρισμός. Πρόκειται για τη διοργάνωση εκδρομών σε

τόπους που έχουν μεγάλη παραγωγή αρωματικών φυτών και παράλληλα διαθέτουν και μονάδες επεξεργασίας τους (Τσιγαρίδα, 2007, Τζιμήκα, 2013).

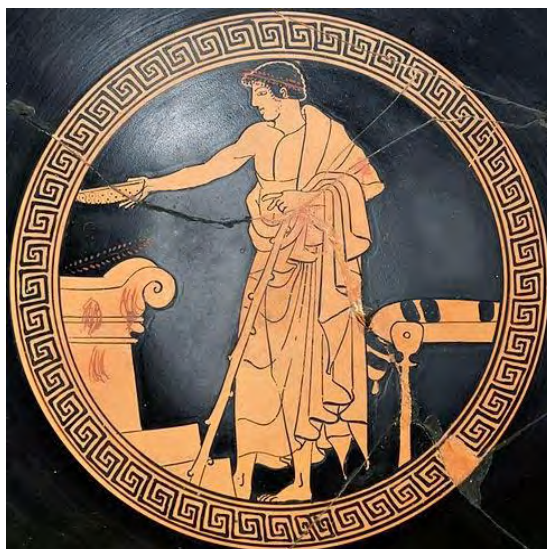
1.5. Η χρήση των αρωματικών φυτών στη μαγειρική τέχνη

Τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιούνται στη μαγειρική ως δρόγη αλλά και ως ροφήματα. Επίσης, χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά – αντιοξειδωτικά (Τσάτσα, 2004). Οι ρωμαίοι θαυμάζοντας το φρέσκο και δροσερό άρωμα τους, τα αξιοποιούσαν και στις σαλάτες. Σιγά – σιγά άρχισαν να τα προσθέτουν και στα φαγητά τους (Φρατζεσκάκης, 2003). Ένα άλλο πολύ αγαπημένο φυτό των Ρωμαίων ήταν το δεντρολίβανο. Το χρησιμοποιούσαν στα φαγητά, αλλά και για να αρωματίσουν διάφορα υγρά.

Στην Αίγυπτο χρησιμοποιούσαν τα αρωματικά φυτά στη μαγειρική, στην αρωματοθεραπεία και στη βαφική, αλλά τα εισήγαγαν και στις θρησκευτικές τελετές τους (Εικ.1.5.1.),(Εικ.1.5.2.).



Εικόνα 1.5.1. Αρχαιοελληνικό δοχείο αρώματος (Πηγή: <http://autochthonesellhnes.blogspot.gr>)



Εικόνα 1.5.2. Αρχαία ιέρεια πραγματοποιεί σπονδή με φυτά (Πηγή: <http://autochthonesellhnes.blogspot.gr>)

1.6. Ορολογία

Το βασίλειο των φυτών περιλαμβάνει περίπου 350.000 διαφορετικά είδη και τα αρωματικά φυτά να αποτελούν μια σχετικά μικρή ομάδα φυτικών ειδών. Πολλά από αυτά λέγονται και φαρμακευτικά γιατί περιέχουν ουσίες με αποδεδειγμένες θεραπευτικές ιδιότητες. Κοινό χαρακτηριστικό των αρωματικών φυτών είναι ότι στα διάφορα φυτικά μέρη τους (π.χ. φύλλα, άνθη) περιέχουν αιθέρια έλαια τα οποία τους προσδίδουν χαρακτηριστική οσμή. Αιθέρια έλαια υπάρχουν πολλές φορές σε όλα τα όργανα του φυτού (βλαστό, ρίζα, φύλλα, οφθαλμούς, άνθη, καρπούς).

- **Αρωματικά φυτά** (aromatics) είναι μία μεγάλη ομάδα ειδών του φυτικού βασιλείου με κοινό χαρακτηριστικό το ότι περιέχουν στα διάφορα μέρη τους (φύλλα, άνθη κ.λπ.) αιθέρια έλαια, ουσίες δηλαδή που όταν ελευθερωθούν αφήνουν οσμή
- **Φαρμακευτικά** χαρακτηρίζονται τα φυτά που τουλάχιστον κάποιο τμήμα τους παράγει χημικές ενώσεις με θεραπευτικές δράσεις για τον άνθρωπο. Από τα φυτά αυτά συλλέγονται από τον άνθρωπο τα χρήσιμα στην ίαση τμήματα τα οποία χρησιμοποιούνται είτε αυτούσια είτε μετά από επεξεργασία. Κατατάσσονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, στα αυτοφυή και στα καλλιεργούμενα. Τα αυτοφυή παλαιότερα κάλυπταν όλες σχεδόν τις

ανάγκες της φαρμακευτικής, αλλά σήμερα είναι ασύμφορη η εκμετάλλευση τους λόγω των υψηλών ημερομισθίων που απαιτεί η συλλογή τους, της δυσκολίας στη συγκέντρωση τους καθώς και της ανομοιογένειας τους ως προς την ποιότητα και την περιεκτικότητα τους σε δραστικές ουσίες. Για να μην καταστραφεί η ενδημική χλωρίδα η συλλογή αυτοφυών φυτών πρέπει να αποφεύγεται όπου ο τοπικός φυτικός πληθυσμός είναι μικρός σε μέγεθος.

- **Αρωματικά –φαρμακευτικά** φυτά σημαίνει ότι τα αρωματικά φυτά διαθέτουν φαρμακευτικές ιδιότητες και έτσι και τα φαρμακευτικά φυτά είναι συνήθως αρωματικά.
- **Βότανα** (herbs) διακινούνται από τον Μεσαίωνα μέχρι σήμερα σε παραδοσιακά εμπορικά καταστήματα τα φυτά που με την ευρύτερη έννοια έχουν ευεργετική ιδιότητα στον άνθρωπο (Τσιγαρίδα, 2007, Τζιμήκα, 2013, Μαυροκουκουλάκη, 2013).

1.7. Τα αρωματικά φυτά στη σύγχρονη Ελλάδα

Η Ελλάδα θεωρείται ο ιδανικός τόπος για την καλλιέργεια των αρωματικών φυτών. Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της χώρας μας ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξή τους και δίνουν προϊόντα εξαιρετικής ποιότητας. Η ελληνική χλωρίδα είναι πλουσιότατη σε είδη και περιλαμβάνει έναν πολύ σημαντικό αριθμό σπάνιων ειδών που απαντούν μόνο στον ελλαδικό χώρο ενδημικά.

Μεγάλο ρόλο παίζει το κλίμα της Μεσογείου. Με το εύκρατο ζεστό και γλυκό κλίμα της είναι γεμάτη από φαρμακευτικά φυτά. Στην Ελλάδα με το έντονο γεωγραφικό ανάγλυφο τα φυτά βρήκαν χώρο να διαφοροποιηθούν και είχαν την ευκαιρία να εξελιχθούν στα διάφορα μικροκλίματα.

Αυτό είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα για την Ελλάδα. Τα μισά από τα φυτά της Ευρωπαϊκής χλωρίδας εντοπίζονται στη χώρα μας. Πρόκειται για περίπου 5.000 ταξινομικές μονάδες κι από αυτές 500-600 έχει αποδειχθεί πως κρύβουν πολύ μεγάλη φαρμακευτική αξία. Είναι τα ίδια φυτά που

χρησιμοποιούσε ο Ιπποκράτης, ο γιατρός της αρχαιότητας (Φρατζεσκάκης, 2003, Τσάτσα, 2004).

Παρόλα αυτά όμως η καλλιέργεια δεν έχει επεκταθεί. Από το σύνολο των 39 εκατ. στρεμ. καλλιεργήσιμης γης στην Ελλάδα, το 44% είναι ορεινές και μειονεκτικές περιοχές, αλλά μόνο το 0,1% αυτών των φτωχών περιοχών καλλιεργούνται με αρωματικά φυτά.

Οι περισσότερες προσπάθειες για οργανωμένη παραγωγή, επεξεργασία και εμπορία αρωματικών φυτών κατέληξαν έως σήμερα σε αποτυχία για λόγους που δεν οφείλονται στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος αλλά στην έλλειψη γενικότερης επιχειρηματικής στρατηγικής.

Η μεγαλύτερη παραγωγή από καλλιέργεια εμφανίζεται στην Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα, ενώ η μεγαλύτερη παραγωγή από την συλλογή αυτοφυών φυτών εμφανίζεται στην Κεντρική και Νότια Ελλάδα.

Η καλλιέργεια αρωματικών φυτών αποτελεί μια άριστη πρόταση παραγωγής για την Ελλάδα γιατί οι νέες τάσεις στη διεθνή αγορά είναι η αναζήτηση νέων κλάδων που μπορούν να σταθούν στον ανταγωνισμό χωρίς άμεσες οικονομικές ενισχύσεις. Στην κατηγορία αυτή υπάρχουν και τα αρωματικά φυτά για την χώρα μας για τους εξής λόγους (Γκολιάρης, 2002):

1. Η χώρα μας διαθέτει ιδιαίτερα αξιόλογο φυσικό συγκριτικό πλεονέκτημα για την παραγωγή αρωματικών φυτών υψηλής ποιότητας, δεδομένης της μεγάλης ποικιλίας ειδών και των ιδιαίτερα ευνοϊκών συνθηκών κλίματος και εδάφους που διαθέτει.
2. Η καλλιέργεια αρωματικών φυτών μπορεί να εξελιχθεί σε έναν από τους δυναμικούς κλάδους γεωργικής παραγωγής (135 φορές πιο κερδοφόρο από το σιτάρι) και να έχει ουσιαστική συνεισφορά στο παραγόμενο οικονομικό προϊόν.
3. Η ευαισθητοποίηση του κοινού στα θέματα προστασίας του περιβάλλοντος και της ανάπτυξης υγιεινών τροφών έχει φέρει στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος την ανάπτυξη νέων

καλλιεργειών και οικοσυστημάτων που να βασίζεται στις αρχές και τους κανόνες της βιολογικής γεωργίας.

4. Όσον αφορά την υποδομή σε μηχανικό εξοπλισμό δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες απαιτήσεις και οι διαδικασίες σποράς και συλλογής μπορούν να πραγματοποιηθούν με συμβατικό εξοπλισμό με μικρές τροποποιήσεις.
5. Δεν είναι ιδιαίτερα απαιτητικά σε νερό, λίπανση και πλούσια εδάφη και επομένως μπορούν να καλλιεργηθούν σε αγροτεμάχια που είτε καλλιεργούνται ήδη φυτά χαμηλής προσόδου είτε είναι ακαλλιέργητα.
6. Συντελούνται ραγδαίες μεταβολές στην αγροτική οικονομία. Η μεταρρύθμιση της ΚΑΠ επιφέρει μείωση επιδοτήσεων και δίνει προτεραιότητα, όπως προαναφέρθηκε, στην ποιότητα και το περιβάλλον.
7. Στήριξη από Κοινοτικά προγράμματα.

Κεφάλαιο 2°

Αναλυτική παρουσίαση των επτά αιθέριων ελαίων του πειράματος

2.1. Γενικά μορφολογικά γνωρίσματα της οικογένειας *Lamiaceae*

Τα πέντε πρώτα αρωματικά φυτά, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν με τη μορφή αιθέριου ελαίου, είναι η ματζουράνα, *Origanum majorana* Linnaeus, 1753, το πατσουλί, *Pogostemon cablin* Benth, 1848, το δενδρολίβανο, *Rosmarinus officinalis* Linnaeus, 1753, το θυμάρι, *Thymus vulgaris* Linnaeus, 1753 και ο βασιλικός, *Ocimum basilicum* Linnaeus, 1753. Παρακάτω, θα τα εξετάσουμε εκτενέστερα και ανήκουν στην παρακάτω ταξινόμηση (<https://el.wikipedia.org>):

Βασίλειο: Φυτά

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα

Υφομοταξία: *Asteridae*

Τάξη: Λαμιάδες (*Lamiales*)

Οικογένεια: Χειλανθή ή Λαμίδες (*Lamiaceae*)

Αριθμός γενών: περίπου 251 (στην Ευρώπη 41, στην Μεσογειακή περιοχή 45, στην Ελλάδα 34) Αριθμός ειδών: περίπου 6700 (στην Ευρώπη 452, στην Ελλάδα 197).

Γεωγραφική εξάπλωση: Η οικογένεια (Είκ.2.1.1.) περιλαμβάνει ποώδη ή ημί-θαμνώδη φυτά, (που εξαπλώνονται σχεδόν σε όλο τον κόσμο, κυρίως σε ανοιχτές περιοχές. Μία από τις περιοχές με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ειδών είναι η λεκάνη της Μεσογείου. Εδώ αντιπρόσωποι των γενών *Micromeria*, *Phlomis*, *Rosmarinus*, *Sideritis*, *Satureja* και *Thymus*, είναι χαρακτηριστικά στοιχεία των φρύγανων αλλά συμμετέχουν και σαν συμπληρωματικά στοιχεία στη μακκία βλάστηση (<https://eclass.upatras.gr>).

Τα φυτά είναι ποώδη ή ημί-θαμνώδη, ενώ οι δενδρώδεις μορφές είναι εξαιρετικά σπάνιες στην οικογένεια (εμφανίζονται μόνον στο Ν. Αμερικανικό γένος *Hyptis* αντιπρόσωποι του οποίου μπορούν να φθάσουν μέχρι τα 12 m ύψος).

Ο βλαστός συνήθως έχει χαρακτηριστική τετράγωνη διατομή. Τα φύλλα είναι κυρίως απλά, αντίθετα και σταυροειδώς διατεταγμένα στον βλαστό και χωρίς παράφυλλα. Τα φυτά καλύπτονται από αδένες ή αδενώδεις τρίχες και έχουν έντονη αρωματική οσμή που οφείλεται στην ύπαρξη αιθέριων ελαίων, και λόγω της παρουσίας αυτών των ουσιών, τα φυτά της οικογένειας έχουν πολύ μεγάλη εμπορική αξία, αφού χρησιμοποιούνται ως αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά.

Τα άνθη είναι ισχυρά ζυγόμορφα, με δίχειλη στεφάνη, που φύονται πολλά μαζί στις μασχάλες των φύλλων κατά μονοχάσια ή διχάσια, που σχηματίζουν σπονδύλους ή σε ακραίους βότρες. Τα άνθη των φυτών της οικογένειας είναι ουσιαστικά ερμαφρόδιτα, αλλά σε αρκετά είδη πχ., των γενών *Mentha*, *Nepeta*, *Zizyphora*, *Thymus* μέχρι και 50 % των φυτών μπορεί να έχουν άνθη όπου τα αρσενικά μέρη (στήμονες) είναι υποπλασμένα και άγονα και τα άνθη λειτουργούν ως θηλυκά. Σε αυτές τις περιπτώσεις η στεφάνη συνήθως είναι μικρότερη και τα χρώματά της είναι πιο άτονα.

Ο κάλυκας είναι συσσέπαλος, 5μερής, δίχειλος και περιβάλλει τον επιμήκη σωλήνα της δίχειλης, 5μερούς στεφάνης. Από τα 5 πέταλα της στεφάνης, συνήθως τα 3 σχηματίζουν το κάτω χείλος και τα 2 το πάνω. Σπανιότερα τα 4 σχηματίζουν το κάτω και το 1 το πάνω ή όλα μαζί το κάτω, ενώ το επάνω λείπει τελείως (*Teucrium*) και τότε οι στήμονες είναι εντελώς ακάλυπτοι. Οι Στήμονες είναι 4 (ο διάμεσος λείπει), είναι ανά ζεύγη ανισομήκεις (διδύναμοι) και συμφύονται με τη στεφάνη(συμπέταλοι). Σε μερικά γένη (*Salvia*, *Rosmarinus*) υπάρχει μόνο το κατώτερο ζεύγος των κοντών στημόνων ή τουλάχιστον αυτό μόνο είναι γόνιμο. Η ωοθήκη είναι επιφυής, και αποτελείται από 2 καρπόφυλλα, είναι όμως 4-χωρη. Χωρίζεται, από την άνθηση ακόμα, σε τέσσερις, βαθείς λοβούς με την βοήθεια ψεύδο-διαφράγματος. Τα τέσσερα αυτά τμήματα της ωοθήκης, που περιέχουν από μία σπερμοβλάστη, διογκώνονται σφαιρικά και μετατρέπονται σε σχιζοκάρπιο, που διασπάται σε τέσσερα καρπίδια (μονόσπερμα κάρυα), σπανιότατα σχηματίζουν μικρές δρύπες (*Prassium*). Ο στύλος βρίσκεται στη βάση των καρπόφυλλων και μεταξύ αυτών (στύλος γυνοβασικός), (<https://eclass.upatras.gr>).

Η επικονίαση των φυτών γίνεται με πολλούς τρόπους όπου μπορεί να συμμετέχουν διάφορα έντομα ή διάφορες μορφές λεπιδοπτέρων (πεταλούδες), ή ακόμη και πουλιά. Ένας ιδιαίτερος μηχανισμός συναντάται στο γένος *Salvia*. Τα έντομα που επισκέπτονται τους αντιπροσώπους του γένους προσγειώνονται στο κάτω χείλος της στεφάνης και με το κεφάλι τους προσκρούουν σε ένα αρθρωτό συνοχέα του νήματος του στήμονα, ο οποίος κλείνει την είσοδο για την κοιλότητα με το νέκταρ. Με αυτή την

κίνηση το άλλο άκρο του βραχίονα του στήμονα κατεβαίνοντας φέρνει σε επαφή με την ράχη του εντόμου τον ανθήρα (και το περιεχόμενό του την γύρη).

Αντιπρόσωποι της οικογένειας με πολύ μακρύ σωλήνα της στεφάνης επικονιάζονται με την βοήθεια πουλιών με αντίστοιχα μεγάλο ράμφος.

Σε κάποιους αντιπρόσωπους των γενών *Hyptis* και *Aeollanthus* στην τροπική Αφρική τα κλειστά πέταλα κρατάνε την γύρη η οποία απελευθερώνεται βιαίως, με την επαφή ενός εντόμου επικονιαστού και η οποία τότε το περιβάλλει (<https://eclass.upatras.gr>).

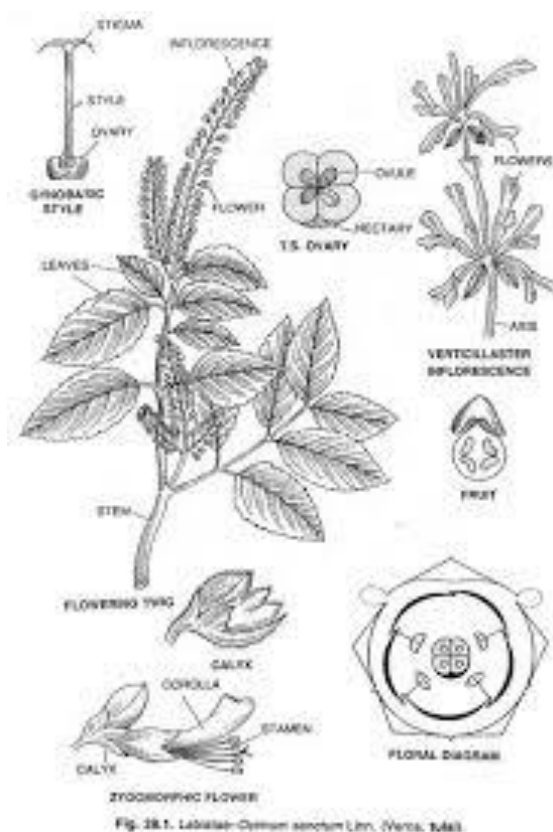


Fig. 28.1. Labialis-Ocimum sanctum Linn. (Vavilov, 1948)

Εικόνα 2.1.1. Οικογένεια *Lamiaceae* (Πηγή: <http://www.biologydiscussion.com>)

2.1.1. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum majorana* Linnaeus 1753 (Μαντζουράνα)

Βασίλειο: Plantae

Συνομοταξία: Angiosperms

Ομοταξία: Eudicots

Υφομοταξία: Asterids

Τάξη: Lamiales

Οικογένεια: Lamiaceae

Είδος: *majorana*



Εικόνα 2.1.1.1. *Origanum majorana* L (Πηγή: <https://en.wikipedia.org>)

Η μαντζουράνα (Εικ. 2.1.1.1.) είναι ένα από τα είδη της ρίγανης που το συναντάμε κυρίως στις χώρες της Νοτίου Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής. Στην Ελλάδα υπάρχει σαν αυτοφυές, ωστόσο συνηθίζεται να καλλιεργείται από την αρχαιότητα σε γλάστρες και κήπους σαν καλλωπιστικό, ενώ γίνεται προσπάθεια να καλλιεργηθεί σε μεγάλη έκταση (Ξυδιά, 2010).

Το αιθέριο έλαιο του *Origanum majorana* είναι εμπορικά γνωστό ως «Έλαιο γλυκιάς μαντζουράνας» (oil of sweet marjoram). Παρασκευάζεται με απόσταξη ατμού των αποξηραμένων φύλλων και των ανθισμένων κορυφών των κλαδιών της μαντζουράνας, με απόδοση περίπου 0,7 -3,5%. Το χρώμα του ελαίου είναι ωχρό, η γεύση του είναι ελαφρά πικάντικη και η επίγευση του λίγο πικρή, ενώ το άρωμά του είναι απαλό και διεισδυτικό και μοιάζει με της λεβάντας (Peter, 2001)

Τα φύλλα της είναι μικρά, ωοειδή, μαλακά. Έχουν ευχάριστη και ισχυρή οσμή που θυμίζει λεβάντα με γεύση καυστική και πικρή. Ο βλαστός είναι πολύκλαδος τετραγωνικός, σκληρός, λεπτός, τριχωτός, κοκκινωπός, σχεδόν λείος και ύψος 20 έως 40 εκατοστά.

Τα άνθη είναι μικρά πρασινό-άσπρα σε προμήκη σταχύδια, που σχηματίζουν σφαιρικές φόβες. Τα σπέρματα είναι μικρά, προμήκη και καστανόμελانا (Ξυδιά, 2010).

Θεωρείται ότι το φυτό της μαντζουράνας έχει αντισπασμωδικές, αντισηπτικές, αντinueυραλγικές, αντικεφαλαλγικές ιδιότητες. Η καλλιεργούμενη μαντζουράνα είναι λιγότερο αντισηπτική αλλά έχει ισχυρότερη εντερική δράση. Η χρήση του ως αφέψημα είναι εσωτερική και εξωτερική. Τα σπέρματα χρησιμοποιούνται στη ζαχαροπλαστική μικρών κουφέτων.

Σύμφωνα με τον Bussata (2008), η αντιμικροβιακή δράση του ελαίου της μαντζουράνας έδρασε κατά ορισμένων ειδών βακτηρίων ακόμα και σε τρόφιμα (σε νωπό λουκάνικο) με τιμές χαμηλότερες από το MIC, ενώ παρατηρήθηκε το βακτηριοκτόνο αποτέλεσμα της σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ελαίου που επίσης, προκάλεσαν αλλοιώσεις στη γεύση του προϊόντος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου μαντζουράνας σε νωπό λουκάνικο άσκησε το βακτηριοστατικό αποτέλεσμα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ελαίου.

Επίσης, η μικροβιοκτόνος δράση του εκχυλίσματος μεθανόλης του *Origanum majorana* L. δοκιμάστηκε έναντι επτά μυκήτων (*Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *A. Parasiticus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizoctonia oryzae-sativae* και *Alternaria brassicicola*) και έξι βακτηρίδια (*Bacillus subtilis*, *B. Megaterium*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*). Το εκχύλισμα μεθανόλης του *O. majorana* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικό φυτικό προστατευτικό έναντι διαφορετικών παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων. Έχει διαγνωστεί υψηλή τοξικότητα έναντι της ανάπτυξης του *Aspergillus niger* (Leeja and Thoppil, 2007).

2.1.2. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Pogostemon cablin* Benthām 1848 (Πατσουλί)

Βασίλειο: Plantae

Συνομοταξία: Angiosperms

Ομοταξία: Eudicots

Υφομοταξία: Asterids

Τάξη: Lamiales

Οικογένεια: Lamiaceae

Είδος: cablin



Εικόνα 2.1.2.1. *Pogostemon cablin* (Πηγή: <http://www.healthcare-supplement.com>)

Το πατσουλί (Εικ, 2.1.2.1.) (*Pogostemon cablin*) είναι ένα σημαντικό βότανο που διαθέτει πολλές θεραπευτικές ιδιότητες καλλιεργείται εκτεταμένα στην Ινδονησία, τη Μαλαισία, την Κίνα και τη Βραζιλία (Miyazawa *et al.*, 2000).

Στις παραδοσιακές ιατρικές πρακτικές, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία κρυολογημάτων, πονοκεφάλων, πυρετού, ναυτίας, εμέτου, διάρροιας, κοιλιακού πόνου, τσιμπήματα εντόμων και φιδιών. Είναι σημαντικό επίσης, στην αρωματοβιομηχανία. Στην αρωματοθεραπεία, το πατσουλί έλαιο χρησιμοποιείται για να ανακουφίσει την κατάθλιψη, το άγχος, τα ήρεμα νεύρα, τον έλεγχο της όρεξης και τη βελτίωση του σεξουαλικού ενδιαφέροντος (Swamy and Sinniah, 2015). Στην κινέζικη ιατρική χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες (Murugan and Livingstone, 2010). Το βαρύ και έντονο άρωμα του πατσουλί έχει χρησιμοποιηθεί εδώ και αιώνες σε αρώματα και πιο πρόσφατα σε θυμίαμα (Miyazawa *et al.*, 2000).

Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί και αναγνωριστεί από το πατσουλί, περισσότερες από 140 ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των τερπενοειδών, φυτοστερολών, φλαβονοειδών, οργανικών οξέων, λιγνινών, αλκαλοειδών, γλυκοσιδίων,

αλκοολών, αλδεϋδών. Οι κύριες φυτοχημικές ενώσεις είναι αλκοόλη πατσουλίου, α-πατσουλυλένιο, β-πατσουλένιο, α-βολνεσένιο, σεϋχελλένιο, νορπατσουουλενόλη, πωγκοσόνη, ευγενόλη και πογοστολ (Murugan and Livingstone, 2010 ,Swamy and Sinniah, 2015).

Σύγχρονες μελέτες αποκάλυψαν διάφορες βιολογικές δραστηριότητες όπως αντιοξειδωτικές, αναλγητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντι-αιμοπεταλιακές, αντιθρομβωτικές, αφροδισιακές, αντικαταθλιπτικές, αντιμεταλλαξιογόνες, αντιεμετικές, ινωδολυτικές και κυτταροτοξικές. Ωστόσο, ορισμένες από τις παραδοσιακές χρήσεις πρέπει να επαληθευθούν και μπορεί να απαιτούν την τυποποίηση και την πιστοποίηση της βιοδραστικότητας των καθαρισμένων ενώσεων μέσω επιστημονικών μεθόδων (Swamy and Sinniah, 2015).

Χρησιμοποιείται ως γευστικός παράγοντας σε χαμηλή περιεκτικότητα σε σε αλκοολούχα και μη αλκοολούχα ποτά. Επίσης, χρησιμοποιείται ως αρωματικός παράγοντας στη καραμέλα, σε διάφορα κατεψυγμένα προϊόντα, σε γαλακτοκομικά επιδόρπια, ζελατίνες, στη πουτίγκα και σε προϊόντα κρέατος (Murugan and Livingstone, 2010).

2.1.3. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Rosmarinus officinalis* Linnaeus 1753 (Δενδρολίβανο)

Βασίλειο: Φυτά

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα

Υφομοταξία: Asteridae

Τάξη: Λαμιώδη (*Lamiales*)

Οικογένεια: Χειλανθή ή Λαμίδες
(*Lamiaceae*)

Είδος: *officinalis*



Εικόνα 2.1.3.1. *Rosmarinus officinalis* (Πηγή: <http://www.theseedsmaster.com>)

Το δενδρολίβανο (Εικ. 2.1.3.1.) είναι πυκνόφυλλος και πολύκλαδος θάμνος με ύψος που δε ξεπερνά τα 2 μέτρα. Τα φύλλα του είναι δερματώδη, μικρά , γραμμοειδή και μοιάζουν με πευκοβελόνες. Η πάνω επιφάνεια των φύλλων έχει χρώμα σκούρο πράσινο και η κάτω επιφάνεια είναι ελαφρώς χνουδωτή με χρώμα λευκό ή αχνά γκριζωπό. Τα άνθη βρίσκονται κατά ομάδες και βγαίνουν στις μασχάλες των φύλλων. Το χρώμα τους είναι μοβ, κυανόλευκο ή και λευκό.

Δεν έχει ιδιαίτερη ανάγκη από πότισμα και μπορεί να φυτρώσει και σε βραχώδεις ορεινές περιοχές. Οι βλαστοί έχουν ένα ευχάριστο άρωμα που μοιάζει με αυτό του τσαγιού και η γεύση τους είναι ελαφρώς πικρή και λίγο καυτερή (<https://el.wikipedia.org>).

Τα εκχυλίσματα και το αιθέριο έλαιο του είδους *Rosmarinus officinalis* έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι μεγάλου εύρους βακτηρίων και μυκήτων, που προσβάλλουν κυρίως τις τροφές και κατ'επέκταση τον ανθρώπινο οργανισμό, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για χρήση ως συντηρητικά των τροφίμων και ως πρόσθετα σε καλλυντικά ,(Bozin *et al.*, 2007, Jiang *et. al.*, 2011).

Επίσης το έλαιο του δεντρολίβανου έχει βρεθεί δραστικό έναντι εντόμων φορέων της ασθένειας της λεϊσμανίασης, όπως το είδος *Aedes aegypti* (Waliwitiya *et al.*, 2009). Επιπροσθέτως, η υψηλή αντιφλεγμονώδης δράση του δεντρολίβανου οφείλεται σε φυσικά ισχυρά αντιοξειδωτικά, όπως είναι η καρνοσόλη (Johnson, 2011). Έχει αναφερθεί ότι το ενεργό συστατικό του δεντρολίβανου, γνωστό ως καρνοσικό οξύ (CA), μπορεί να προστατεύσει τον εγκέφαλο από το εγκεφαλικό και τη νευροεκφύλιση, που οφείλεται στα επιβλαβή χημικά και τις ελεύθερες ρίζες.

Πειράματα αντικαρκινικής δράσης εκχυλισμάτων *R. officinalis* επιβεβαίωσαν ότι η καρνοσόλη είναι το κύριο δραστικό συστατικό, υπεύθυνο για τη δράση έναντι του καρκίνου του πρόστατη, του στήθους, του εντέρου και της λευχαιμίας (Johnson, 2011).

2.1.4. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Thymus vulgaris* Linnaeus 1753 (Θυμάρι)

Βασίλειο: Plantae

Συνομοταξία: Angiosperms

Ομοταξία: Eudicots

Υφομοταξία: Asterids

Τάξη: Lamiales

Οικογένεια: Lamiaceae

Είδος: *vulgaris*



Εικόνα 2.1.4.1. *Thymus vulgaris* (Πηγή: <http://www.uniprot.org>)

Θάμνος πολυετής που φθάνει σε ύψος τα 30 εκ. και προτιμά τα ξηρά εδάφη (ελαιώνες). Είναι πολύκλαδο, έχει φύλλα μικρά, σχεδόν άμισχα, με χρώμα φωτεινό πράσινο – γκριζωπό, χνούδι εκ των κάτω και με τα άκρα ελαφρώς τυλιγμένα προς την άνω επιφάνεια (Εικ. 2.1.4.1.). Τα άνθη τους είναι ρόδινα με σωλήνα στεφάνης πολύ κοντό και στήμονες που προεξέχουν. Ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών χαρακτηριστικό της Μεσογειακής ζώνης. Θυμίζει λίγο τη μαντζουράνα και τη ρίγανη, ακόμη και με το διαπεραστικό και ευχάριστο άρωμά του. Ανθίζει από το Μάιο μέχρι τον Οκτώβριο.

Το συναντάμε σε χώρες της Ασίας και της Μεσογείου αλλά και στη Βόρεια Αμερική. Στην Ελλάδα το θυμάρι φυτρώνει σε ξηρούς άγονους και πετρώδεις τόπους της κατώτερης ζώνης (Φρατζεσκάκης, 2003).

Κατά την ανάλυση πληθυσμών θυμαριού που βρέθηκαν στην νότια Γαλλία, στις πολυάριθμες χημικές ενώσεις του, βρέθηκαν έξι μονοτερπένια τα οποία είναι geraniol, linalol, alpha-terpineol, thuyanol, thymol και carvacrol (Vernet et al., 1986).

Το θυμάρι επίσης, έχει αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Miura *et al.*, 2002). Σύμφωνα με τους Lee *et al.*, (2005) το έλαιο του θυμαριού κατέστειλε σημαντικά τα επίπεδα των ανθρώπινων λιπιδίων της LDL. Επιπροσθέτως, έχει αντιμυκητιακή δράση. Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού αναστέλλει σε ορισμένες περιπτώσεις, πλήρως την ανάπτυξη ορισμένων μυκήτων όπως του *Aspergillus flavus* (Kumar *et al.*, 2008).

2.1.5. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Ocimum basilicum* Linnaeus 1753

(Βασιλικός)

Βασίλειο: Plantae

Συνομοταξία: Angiosperms

Ομοταξία: Eudicots

Υφομοταξία: Asterids

Τάξη: Lamiales

Οικογένεια: Lamiaceae

Είδος: *basilicum*



Εικόνα 2.1.5.1. *Ocimum basilicum* (Πηγή: <http://www.biolib.cz>)

Ο βασιλικός (Εικ. 2.1.5.1.) είναι φυτό αρωματικό και φαρμακευτικό. Πρωτοήλθε στην Ελλάδα από την Ινδία και καλλιεργείται για φαρμακευτική χρήση και για το αιθέριο έλαιό του. Αυτοφύεται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Ως επί το πλείστον είναι φυτό καλλιεργήσιμο. Καλλιεργείται εκτεταμένα στην Γαλλία, Αίγυπτο, Ινδονησία, Μαρόκο, στις Ηνωμένες Πολιτείες (Αριζόνα, Καλιφόρνια, Νέο Μεξικό, Βόρεια Καλιφόρνια), στην Ελλάδα και στο Ισραήλ.

Ο βασιλικός ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae). Υπάρχουν και άλλα είδη βασιλικού αυτό που εξετάζεται στη παρούσα εργασία ανήκει στο είδος *Ocimum basilicum* L. Είναι φυτό μονοετές, πολύκλαδο με ύψος ανάλογα με την ποικιλία 20 - 80 cm. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες και υβρίδια, περισσότερες από 60, λόγω του πολυμορφικού χαρακτήρα του φυτού και την διασταυρούμενη γονιμοποίηση. Το πιο σημαντικό από οικονομική άποψη είναι ο πλατύφυλλος βασιλικός που έχει μεγάλα φύλλα και πολύ γλυκό άρωμα, γι' αυτό αναφέρεται και ως γλυκός βασιλικός (Τσάτσα, 2004).

Ο βασιλικός, όπως και τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια για τα οποία μιλήσαμε, έχει αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιακές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Τα αιθερικά έλαια που διερευνήθηκαν παρουσίασαν καλή αντιοξειδωτική δράση, όπως μετρήσεις με ικανότητα DPPH ελεύθερης ρίζας-απορρόφησης, λεύκανση β-καροτίνης στο σύστημα λινελαϊκού οξέος και αναστολή της οξείδωσης του λινολεϊκού οξέος. Αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των αιθερίων ελαίων και της λιναλόλης, το πλέον άφθονο συστατικό, έναντι των βακτηριακών στελεχών: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida* και παθογόνοι μύκητες *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Fusarium solani*, *Botryodiplodia theobromae*, *Rhizopus solani* (Hussain *et al.*, 2008).

Τα κύρια συστατικά αρώματος του βασιλικού είναι 3,7-διμεθυλο-1,6-οκταδιεν-3-όλη (linalool · 3,94 mg / g), 1-μεθοξυ-4- (2-προπενυλο) βενζόλιο), κινναμωμικό μεθύλιο (1,28 mg / g), 4-αλλυλ-2-μεθοξυφαινόλη (ευγενόλη, 0,896 mg / g) και 1,8-cineol (0,288 mg / g), (Lee *et al.*, 2005).

Από παρατηρήσεις επίσης στην Ελλάδα, φαίνεται να συμβάλλει στη διατήρηση της μνήμης. Λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση της υγιεινής και στην συντήρηση των τροφίμων (Juliani and Simon, 2002).

2.2. Γενικά μορφολογικά γνωρίσματα της οικογένειας *Myrtaceae*

Τα επόμενα δυο αρωματικά φυτά, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν με τη μορφή αιθέριου ελαίου, είναι το τειόδεντρο, *Malaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher, 1905) Cheel, 1925 και ο ευκάλυπτος, *Eucalyptus globulus* Labillardiere, 1804. Παρακάτω, θα τα εξετάσουμε εκτενέστερα και ανήκουν στην παρακάτω ταξινόμηση (<https://el.wikipedia.org>):

Βασίλειο: Plants

Συνομοταξία: Angiosperms

Ομοταξία: Eudicots

Υφομοταξία: Rosids

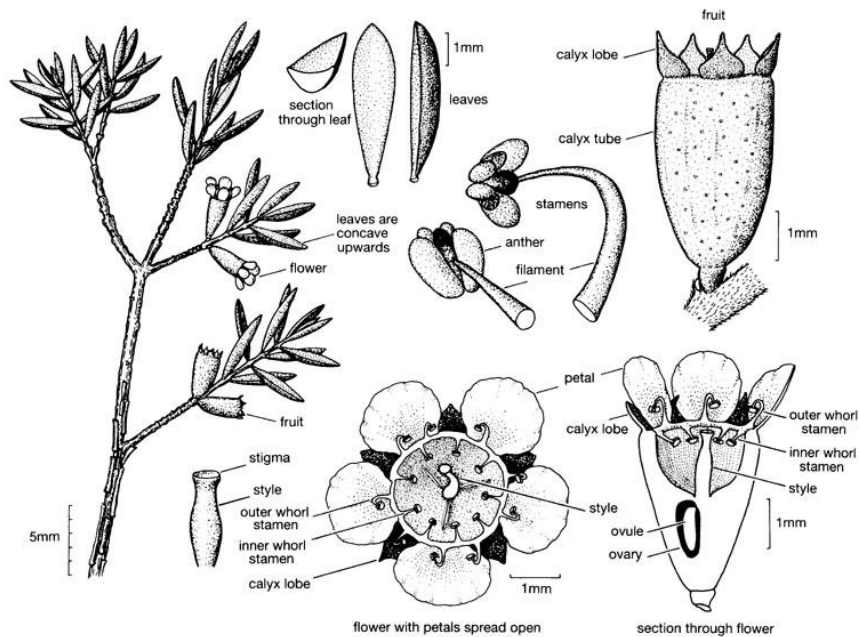
Τάξη: *Myrtales*

Οικογένεια: *Myrtaceae*

Η *Myrtaceae*, είναι μια οικογένεια (Εικ. 2.2.1.) δικοτυλήδονων. Τα γένοι *Myrtle*, το *pohutukawa*, το *bay rum tree*, *clove*, *guava*, *acca (feijoa)*, *allspice*, και *eucalyptus* είναι όλα μέλη αυτής της ομάδας. Όλα τα είδη είναι ξυλώδη, με αιθέρια έλαια και μέρη λουλουδιών σε πολλαπλάσια τεσσάρων ή πέντε. Ένας αξιοσημείωτος ο χαρακτήρας της οικογένειας είναι ότι το φλοιώμα βρίσκεται και στις δύο πλευρές του ξύλου, όχι μόνο έξω, όπως στα περισσότερα φυτά. Τα φύλλα είναι αειθαλής, απλά και συνήθως με ένα ολόκληρο (όχι οδοντωτό) περιθώριο. Τα λουλούδια έχουν ένα βασικό αριθμό από πέντε πέταλα, αν και σε πολλά γένη τα πέταλα είναι λεπτά ή απουσιάζουν. Οι στήμονες είναι συνήθως πολύ εμφανείς, έντονα χρωματιστές και πολυάριθμες (<https://el.wikipedia.org>).

Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, οι οικογένεια *Myrtaceae* περιλαμβάνει περίπου 5950 είδη σε περίπου 132 γένη. Η οικογένεια έχει μια ευρεία κατανομή σε τροπικές και θερμές περιοχές του κόσμου και είναι συνηθισμένη σε πολλά από τα ενεργειακά σημάδια της παγκόσμιας βιοποικιλότητας. Τα γένη με καπούλια όπως *Eucalyptus*, το *Corymbia*, το *Angophora*, το *Leptospermum* και το *Melaleuca* απουσιάζουν από την Αμερική, εκτός από τον *Metrosideros*, όπως επίσης στη Χιλή και την Αργεντινή.

Τα γένη με σαρκώδη φρούτα έχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους στην ανατολική Αυστραλία και τη Μαλεσία (την οικοζώνη της Αυστραλίας). Ο *Eucalyptus* είναι ένα κυρίαρχο, σχεδόν πανταχού παρόν γένος στα πιο μεσαία μέρη της Αυστραλίας και επεκτείνεται βόρεια σποραδικά και στις Φιλιππίνες. Το *Eucalyptus regnans* είναι το ψηλότερο ανθοφόρο φυτό στον κόσμο. Άλλα σημαντικά αυστραλιανά γένη είναι το *Callistemon*, το *Syzygium* και το *Melaleuca*. Τα είδη του γένους *Osbornia*, που προέρχονται από την Αυστραλασία, είναι μαγγρόβια. Το γένος *Eugenia*, *Myrcia* και *Calyptranthes* ανήκουν στα μεγαλύτερα γένη των νεοτροπικών.



Εικόνα 2.2.1. Οικογένεια *Myrtaceae* (Πηγή: <https://www.anbg.gov.au>)

2.2.1. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Malaleuca alternifolia* Maiden & Betcher, 1905 (Τειϊόδεντρο)

Βασίλειο: Plants

Συνομοταξία:

Angiosperms

Ομοταξία: Eudicots

Υφομοταξία: Rosids

Τάξη: *Myrtales*

Οικογένεια: *Myrtaceae*

Είδος: *alternifolia*



www.alamy.com - BJN08T

Εικόνα 2.2.1.1 *Malaleuca alternifolia* (Πηγή: <http://www.alamy.com>)

Το *Melaleuca alternifolia* (Εικ. 2.2.1.1.) είναι ένα είδος δέντρου ή ψηλός θάμνος στην οικογένεια *Myrtaceae*. Είναι ενδημικό είδος στην Αυστραλία, εμφανίζεται στο

νοτιοανατολικό Κουίνσλαντ και στη βόρεια ακτή και στις γειτονικές σειρές της Νέας Νότιας Ουαλίας, όπου αναπτύσσεται κατά μήκος ποταμών και σε καταπράσινα μέρη της ηπείρου και συχνά είναι το κυρίαρχο είδος όπου εμφανίζεται.

Το *Melaleuca alternifolia* είναι ένα μικρό δέντρο περίπου 7 μ. (20 πόδια) με ένα στενό κορόνα και λευκόχρυσο φλοιό. Τα φύλλα είναι διατεταγμένα ακανόνιστα, διάσπαρτα ή στρογγυλά, και το σχήμα των φύλλων είναι γραμμικό, με μήκος 10-35 mm (0,4-1 in) και πλάτος 1 mm (0,04 in), απαλό και μαλακό.

Τα λουλούδια εμφανίζονται σε άσπρες ή κρεμ χρώματος μάζες αιχμές 3-5 εκατοστά (1-2 ίντσες) σε μια σύντομη περίοδο, κυρίως άνοιξη στις αρχές του καλοκαιριού, και δίνουν στο δέντρο μια εμφάνιση που δείχνει αφράτο. Τα μικρά ξυλώδη φρούτα σε σχήμα κυπέλλου, διαμέτρου 2-3 mm (0,08-0,1 ίντσες), είναι διάσπαρτα κατά μήκος των κλάδων (<https://el.wikipedia.org>).

Το αιθέριο έλαιο του τεϊόδεντρου χρησιμοποιείται στην εναλλακτική ιατρική της Αυστραλίας και έχει διάφορες φαρμακευτικές ιδιότητες όπως αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές, αναλγητικές κ.α. (Καραφέρης, 2013). Ως επί το πλείστον είναι βακτηριοκτόνο στη φύση και τα περισσότερα βακτήρια είναι ευαίσθητα σε συγκεντρώσεις έως και 1% όπως είναι *Eshcerichia coli*, *Bacillus cereus* και *Lactobacillus spp.* (Carson *et al.*, 2006).

Το αιθέριο έλαιο του φυτού *Malaleuca alternifolia* περιέχει περίπου 100 συστατικά, τα οποία είναι υδρογονάνθρακες τερπενίων, κυκλικά μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και τις συναφείς αλκοόλες τους. Τα τρία κύρια συστατικά του είναι terpinen-4-ol, c-terpinene και a-terpinene, αποτελούν το 70% του ελαίου, ενώ τα συστατικά: q-cymene, terpinolene, a-terpineol και arpinene αντιπροσωπεύουν το 15%. Οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες αποδίδονται στα συστατικά: terpinen-4-ol και a-terpinene (Hammer *et al.*, 200, Carson *et al.*, 2006).

Είναι αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό σε ethanol 85% στους 20°C. Η σύνθεση του αλλάζει κυρίως με τη παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου, αλλά κυρίως όταν το έλαιο εκτεθεί στο φως και σε υψηλή θερμοκρασία.

2.2.2. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Eucalyptus globulus Labillardiere* 1804 (Ευκάλυπτος)

Βασίλειο: Plants

Συνομοταξία: Angiosperms

Ομοταξία: Eudicots

Υφομοταξία: Rosids

Τάξη: *Myrtales*

Οικογένεια: *Myrtaceae*

Είδος: *globules*



Εικόνα 2.2.2.1. *Eucalyptus globules* (Πηγή: <https://australianseed.com>)

Ο ευκάλυπτος *globulus* (Εικ. 2.2.2.1.) είναι ένα αειθαλές δέντρο, ένα από τα πιο ευρέως καλλιεργημένα δέντρα που προέρχονται από την Αυστραλία. Αυτά συνήθως αυξάνονται από 30-55 μ. ψηλά. Το ψηλότερο επί του παρόντος γνωστό δείγμα στην Τασμανία είναι 90,7 μ. ψηλό. Υπάρχουν ιστορικές απαιτήσεις ακόμη πιο ψηλών δέντρων, με το ψηλότερο να είναι 101 μ.

Ο φλοιός πέφτει συχνά στο έδαφος, ξεφλουδισμένος σε μεγάλες λωρίδες. Τα ευρέα νεαρά φύλλα βγαίνουν σε αντίθετα ζευγάρια σε τετράγωνα στελέχη. Έχουν μήκος

περίπου 6 έως 15 cm και καλύπτονται με μπλε-γκρι χρώμα, που είναι η προέλευση της κοινής ονομασίας "blue gum". Τα ώριμα φύλλα είναι στενά, δρεπανοειδή και σκοτεινά πράσινα. Διατίθενται εναλλάξ σε στρογγυλεμένους μίσχους και κυμαίνονται από 15-35 cm σε μήκος. Τα μπουμπούκια είναι σε σχήμα κορυφής, με ραβδώσεις και έχουν καπάκι (στο μπουμπούκι λουλουδιών) που φέρει κεντρικό κομβίο. Τα λουλούδια με κρέμα χρωματισμένα φέρονται ξεχωριστά στους φύλακες των φύλλων και παράγουν άφθονο νέκταρ που αποδίδει ένα έντονα αρωματισμένο μέλι. Οι καρποί είναι ξυλώδεις και κυμαίνονται από 1,5-2,5 cm σε διάμετρο. Πολλοί μικροί σπόροι ρίχνονται μέσω βαλβίδων (με αρίθμηση μεταξύ 3 και 6 ανά φρούτο) που ανοίγουν στην κορυφή του φρούτου. Παράγει αρκετές ρίζες στο εδαφικό μέρος που είναι φυτεμένο, ριζοβολώντας αρκετά μέτρα σε ορισμένα εδάφη (<https://el.wikipedia.org>).

Το αιθέριο έλαιο του *Eucalyptus globules*, έχει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες. Σύμφωνα με τους Ghalem and Mohamed (2008), το έλαιο ανέστειλε την ανάπτυξη των βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus*. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό αντιβιοτικό για τη θεραπεία διαφόρων μολυσματικών ασθενειών που προκαλούνται από αυτά τα δύο μικρόβια.

Εκτός από αντιβακτηριδιακές ιδιότητες, έχει και αντιμυκητιακές. Κατάφερε τη πλήρη αναστολή ανάπτυξης των μυκήτων σε είδη όπως *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Η πτητική έκθεση έδειξε ολική αναστολή στο χαμηλότερο επίπεδο που δοκιμάστηκε των 500 μL . Η 1,8-cineone που εξετάστηκε μόνη της έδειξε μερική αναστολή μόνο στο υψηλότερο επίπεδο 1,3492 μL . Η παραγωγή της αφλατοξίνης B1 μειώθηκε στις δοκιμασίες πτητικού υπερκείμενου χώρου και παρατηρήθηκε μερική αναστολή στη δόση των 200 μl αιθέριου ελαίου (Vilela *et al.*, 2009).

Επιπλέον, το έλαιο διαθέτει ένα ευρύ φάσμα βιολογικής δραστηριότητας, περιλαμβανομένου του αντιμικροβιακού, μυκητοκτόνου, εντομοκτόνου /εντομοαπωθητικού, ζιζανιοκτόνου, ακαρεοκτόνου και νηματοκτόνου δραστικού φάσματος. Η χρήση του ελαίου ευκαλύπτου ως φυσικού φυτοφαρμάκου έχει τεράστια σημασία λόγω των περιβαλλοντικών και τοξικολογικών συνεπειών της αδιάκριτης χρήσης συνθετικών παρασιτοκτόνων και της μείωσης του προβλήματος της αυξανόμενης αντοχής των παρασίτων (Batish *et al.*, 2008).

Κεφάλαιο 3^ο

*Ανθρώπινες ασθένειες που οφείλονται σε *Exophiala spp.**

3.1. Γνωριμία με το γένος του μύκητα *Exophiala*

Το γένος *Exophiala* περιλαμβάνει διαφορικούς μύκητες ευρέως κατανεμημένους στη φύση. Πολλά μέλη του γένους *Exophiala* είναι δυνητικοί παράγοντες ανθρώπινων και ζωικών μυκητιάσεων (Porteous *et al.*, 2003, Zeng *et al.*, 2007, Woo *et al.*, 2012, Sav *et al.*, 2016). Το γένος *Exophiala* περιλαμβάνει μερικά σημαντικά είδη πρόκλησης ανθρώπινων συστηματικών ασθενειών. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα ειδών του γένους είναι η μορφολογική τους πλαστικότητα, καθώς τείνουν να περάσουν από πολύπλοκους κύκλους ζωής όπου διαγνωστικά, αυτά τα χαρακτηριστικά εκφράζονται μεταβλητά (Zeng *et al.*, 2008).

Το γένος *Exophiala*, αποτελείται από 28 είδη. Κάποια ψυχρόφιλα και κάποια θερμόφιλα που προκαλούν δερματικές και νευρολογικές ασθένειες στη συστηματική τους μορφή στον άνθρωπο. Όπως είναι η μέλαινα μυκητίαση, ο μαδούριος πους και η εγκεφαλική φαιοϋφομύκωση.

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του μύκητα είναι το μαύρο χρώμα της αποικίας όταν καλλιεργείται σε υποστρώματα ειδικά για μύκητες όπως Sabouraux και Potato Dextrose Agar (Εικ.3.1.1.). Λόγω των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους στην αρχή του σχηματισμού αποικιών, αυτοί οι μύκητες συχνά αναφέρονται επίσης ως «μαύρες ζύμες», μια λανθασμένη ονομασία που μερικές φορές μπορεί να παραπλανήσει ως προς την επιλογή των αντιμυκητιακών θεραπευτικών παραγόντων που θα χρησιμοποιηθούν (Woo *et al.*, 2012).



Εικόνα 3.1.1. Καλλιέργεια *exophiala spp.* σε Potato Dextrose Agar (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Οι μύκητες είναι φυσικοί κάτοικοι εδάφους και νερού και ορισμένα είδη συμπεριφέρονται ως ευκαιριακά παθογόνα στον άνθρωπο (Arvanitidou *et al.*, 1999). Εκτός από ένα ανθρώπινο ξενιστή, μέλη του γένους *Exophiala* συναντώνται συχνά σε ανθρώπινα, σε ζεστά και υγρά περιβάλλοντα με χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά όπως σε τουρκικές και φινλανδικές σάουνες, μπάνια, πλυντήρια πιάτων και πλυντήρια ρούχων.

Ορισμένα είδη *Exophiala* εμφανίζονται επίσης σε βράχια και σε πόσιμο νερό και υπόγεια ύδατα (Woo *et al.*, 2012, Sav *et al.*, 2016). Τα είδη *Exophiala* μπορούν να απομονωθούν συχνά από oligotrophic πηγές νερού, όπως νεροχύτες, αποχετεύσεις, πισίνες και εγκαταστάσεις κολύμβησης (Porteous *et al.*, 2003). Σε μια πρόσφατη έρευνα που έγινε σε Γερμανία και Σλοβενία το γένος *Exophiala* βρέθηκε ότι είναι ένα από τα τρία γένη που διαδόθηκαν αποτελεσματικά από πόσιμο νερό που προέρχεται από υπόγεια ύδατα. (Porteous *et al.*, 2003, Babic *et al.*, 2016).

3.2. Το γένος *Exophiala* ως αιτία φαιοφυομυκητίασης στον άνθρωπο

Τα τελευταία χρόνια η συχνότητα εμφάνισης αυτών των μυκήτων έχει αυξηθεί ως αιτία ανθρώπινων φαιοφυομυκώδων (Calvo *et al.*, 2010, Tokuhisa *et al.*, 2010, Kan *et al.*, 2012, Fukai *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2013, Najafzadeh *et al.*, 2013).

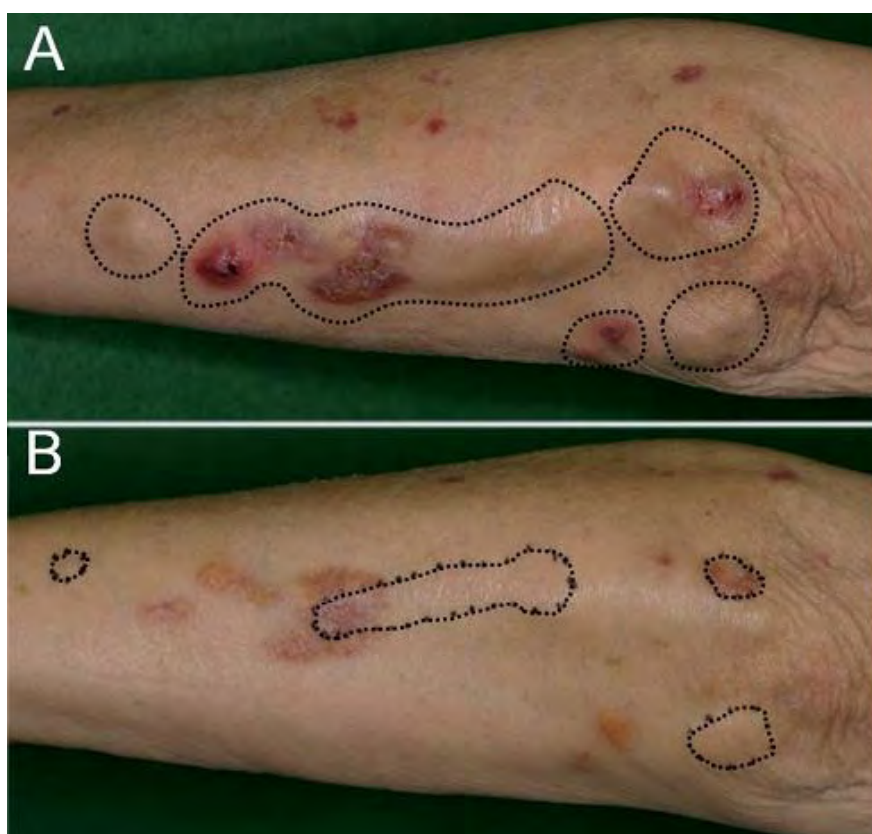
Η φαιοφυομυκητίαση είναι μία σπάνια δερματική ασθένεια που προκαλείται από καφέ, χρωματισμένους μύκητες, που ανιχνεύονται στον μολυσμένο ιστό σαν σωματίδια όπως ζυμομύκητες, στοιχεία που μοιάζουν με ψευδοφυλάκια ή μονολιθικές υφές. Η φαιοφυομυκητίαση είναι μια ευκαιριακή λοίμωξη και τα περισσότερα αναφερθέντα περιστατικά έχουν εμφανισθεί σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ιδιαίτερα δε στους λήπτες των μεταμοσχεύσεων (Tokuhisa *et al.*, 2010, Kan *et al.*, 2012).

Επιπλέον, καλύπτει μια ευρεία ποικιλία κλινικών μορφών, συμπεριλαμβανομένων δερματικών (εν τω βάθει και υποδόριων) (Εικ. 3.2.1.), (Εικ. 3.2.2.), του κεντρικού νευρικού συστήματος και λοιμώξεων που διαδίδονται αναπνευστικώς (Najafzadeh *et al.*, 2013). Οι υποδόριες λοιμώξεις εμφανίζονται κυρίως στα άκρα και κυρίως στα δάκτυλα, τους καρπούς, τα γόνατα ή τους αστραγάλους (Yoon *et al.*, 2012). Τα είδη του γένους *Exophiala* που συνηθέστερα εμπλέκονται στη μόλυνση στον άνθρωπο είναι τα *E. Salmonis*, *E. Jeanselmi*, *E. dermatitidis*, *E. moniliae* και *E. spinifera* και το *E. oligosperma* (Tokuhisa *et al.*, 2010).

Επίσης, τα γένη των μυκήτων συμπεριλαμβανομένων των γενών *Alternaria* και *Phialophora* είναι γνωστοί αιτιολογικοί παράγοντες για πρόκληση φαιοφυομυκητίασης και είναι πολύ εύκολο να μπερδευτούν με το γένος *Exophiala* (Kan *et al.*, 2012).



Εικόνα 3.2.1. Υποδέρια φαιοϋφνομυκητίαση από *Exophiala salmonis* (Πηγή: Yoon *et al.*, 2012)



Εικόνα 3.2.2. Υποδέρια φαιοϋφνομυκητίαση από *Exophiala oligosperma* (Πηγή: Kan *et al.*, 2012)

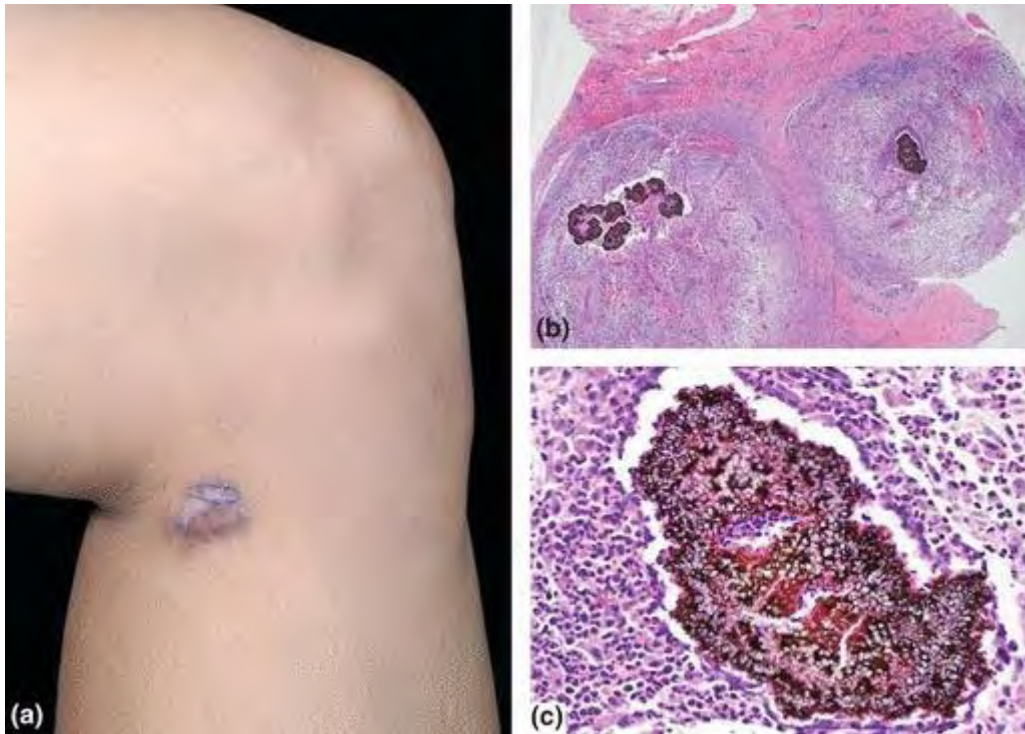
3.3. Πρόκληση μαδούριου πούς λόγω του μύκητα *Exophiala jeanselmei*

Ο μαδούριος πούς (*eumycetoma*) είναι μια χρόνια, προοδευτική, κοκκιωματώδης μόλυνση του δέρματος και του υποδόριου ιστού που προκαλείται από αρσενικούς μύκητες.

Η διαταραχή συνήθως επηρεάζει τα άκρα αφού διεισδύσει στο μολυσμένο σημείο και χαρακτηρίζεται από έκπλυση και σχηματισμό κόλπων εκλύοντας πύον και μυκητιακό υλικό. Ο μαδούριος πούς είναι πιο διαδεδομένος στην τροπική και υποτροπική, ξηρή κλιματική ζώνη της Αφρικής, της Ασίας και της Κεντρικής Αμερικής κ.λπ.

Η ασθένεια είναι μια γενική απάντηση ξένου σώματος στην παρουσία μυκητιακών μικροοκλών στον υποδόριο ιστό. Αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου βρίσκονται σε φυλογενετικά αποκλίνοντα γένη. Μεταξύ των πιο συνηθισμένων ειδών είναι τα *Scedosporium apiospermum* και *Madurella mycetomatis*, αλλά και είδη *Phaeoacremonium* και αρκετές κολομυκήτες απαντώνται τακτικά. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι και το *E. Jeanselmei* προκαλεί και αυτό την ασθένεια.

Το *E. jeanselmei* υπό την περιορισμένη έννοια μέχρι τώρα είναι γνωστό μόνο από ανθρώπινους ασθενείς. Το *Exophiala jeanselmei* είναι μέλος των μαύρων ζυμών και σε ανθρώπινες μολύνσεις, το μυκητιακό υλικό τείνει να συμπυκνώνεται ή να εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας υπό τη μορφή κόκκων (Pattanaprichakul *et al.*, 2013). Παρακάτω βλέπουμε μια περίπτωση πρόκλησης της ασθένειας από *E. Jeanselmei* (Εικ. 3.3.1.)



Εικόνα 3.3.1. (α) Κλινική εκδήλωση: ερυθματώδης συγκολλημένη πλάκα σε μεσαία όψη του αριστερού γόνατος. (β και γ) Μικροσκοπική ανίχνευση της βιοψίας ιστών: φουσκωτό κοκκίωμα με μαύρους κόκκους που αποτελούνται από ευρέα υφάγια στοιχεία σε βαθύ χόριο και υποκόσμιο (Πηγή: Pattanaprichakul *et al.*, 2013)

3.4. Μυκητιασική μελανονυχία λόγω *Exophiala dermatitidis*

Το *Exophiala dermatitidis* είναι ένας απομακρυσμένος μελανόχρωμος οργανισμός που μοιάζει με ζύμη και συναντάται τόσο στο περιβάλλον όσο και σε άγρια ζώα. Αυτός ο μύκητας αποτελεί το κύριο αιτιολογικό παράγοντα μιας σοβαρής φαιοϋφομυκητίασης, που αφορά το δέρμα και άλλα όργανα, ωστόσο η εμφάνιση του βάσει επιδημιολογικών δεδομένων είναι σπάνια στον άνθρωπο.

Το είδος *Exophiala dermatitidis* είναι ένας σαπροφυτικός δερματικός πλειόμορφος μύκητας που απομονώνεται από ασθενείς με φαιοϋφομυκητίαση. Στις τροπικές περιοχές, ο φυσικός οικοτόπος του θεωρούνται επιφάνειες στο φλοιό φρούτων ή/ και το πεπτικό σύστημα ζώων που καταναλώνουν φρούτα. Ωστόσο, πρόσφατα απομονώθηκε από οικιακά περιβάλλοντα σε τροπικά και εύκρατα κλίματα.

Ο *E. Dermatitidis* διακρίνεται φαινοτυπικά από τις κατά το πλείστον βλεννώδεις αποικίες, την ικανότητα να αναπτύσσεται στους 40 ° C, την έλλειψη αφομοίωσης νιτρικών και κυττάρων ζυμομυκήτων που περιβάλλονται από κάψουλες . Το φάσμα των κλινικών ευρημάτων και εκδηλώσεων που προκαλούνται από τον *E. Dermatitidis* περιλαμβάνει νευροτροπικές λοιμώξεις, συστηματική λεμφαδενίτιδα, δερματικές και υποδόριες μολύνσεις, ειδικά σε ανοσοκατασταλμένα άτομα καθώς και βαριά προσβολή του βρογχικού δέντρου και του βρογχικού παρεγχύματος σε κυστικούς ασθενείς με φλεβοκομβική κρίση.

Η δερματίτιδα σπάνια επηρεάζει τα νύχια. λίγα κρούσματα ονυχομυκητίασης έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία σχετικά με το σχηματισμό μυκητιακής μελανονυχίας, όπου αναπτύσσεται μια μαύρη χρωστική ουσία μέσα στην πλάκα του νυχιού..

Ο κύριος παράγοντας κινδύνου που είναι υπεύθυνος για την έναρξη της ονυχομυκητίασης από *Exophiala* θεωρείται η τραυματική εμφύτευση του μύκητα στο νύχι συνήθως μέσω αλληλεπίδρασης με φυτά ή βρωμιά, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η οδός της μόλυνση είναι άγνωστη. Άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν την κακή υγεία, το ζεστό κλίμα, την ανοσοκαταστολή, την κοινοτική κολύμβηση και τα αποφρακτικά οιδήματα.

Δεν υπάρχει εγκεκριμένη αντιμυκητιασική θεραπεία για την ονυχομυκητίαση από τον *E. dermatitidis*. Προηγούμενα κρούσματα μόλυνσης υποβλήθηκαν επιτυχώς σε θεραπεία με τοπικό διάλυμα μυκωναζόλης και τερβινυλίου (Lo *et al.*, 2013).

Κεφάλαιο 4^ο

*Ασθένειες ιχθύων που οφείλονται στο γένος του μύκητα *Exophiala* spp.*

4.1. Υδροφιλα είδη *Exophiala* που προκαλούν ασθένεια σε ψυχρόαιμα ζώα

Οι μυκητιάσεις μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στα εκτρεφόμενα ψάρια και τα οστρακοειδή, σε γόνιο ή αυγά και μερικές φορές σε άγριους θαλάσσιους πληθυσμούς. Τα σπόρια του μύκητα γενικά εντοπίζονται σε όλους τους χώρους των ιχθυοτροφίων και η κακή ποιότητα του νερού οδηγεί σε αύξηση των μυκητιακών λοιμώξεων. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτοί οι παράγοντες είναι πανταχού παρόντες στη φύση και προσβάλλουν κυρίως ζώα που ζουν υπό συνθήκες έντονης καταπόνησης, τραυματισμών, ασθενειών ή ανοσοκαταστολής. Ορισμένοι μύκητες είναι δευτερογενείς ή ευκαιριακοί εισβολείς, αλλά ορισμένοι είναι σοβαροί πρωτογενείς παθογόνοι παράγοντες (Abdel-Sater *et al.*, 2016).

Το *Exophiala* είναι ένα γένος της οικογένειας *Herpotrichiellaceae* ανήκει στο Φύλο *Ascomycota*, τάξη *Chaetothyriales*. Είναι το κύριο γένος των μαύρων ζυμών που χαρακτηρίζεται από βλαστική κονιδιογένεση (Abdel-Sater *et al.*, 2016). Τα περισσότερα είδη προκαλούν δερματικές ή συστηματικές λοιμώξεις σε ψυχρόαιμα, υδροβία ζώα, προκαλώντας μερικές φορές επιδημικές εμφανίσεις (De Hoog *et al.*, 2011).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η πιθανή παθογένεια των μολύνσεων από μαύρες ζύμες στα καρκινοειδή, τα εκτρεφόμενα ψάρια, τα αμφίβια, τα ζώα ενυδρείων και άλλα ψυχρόφιλα σπονδυλωτά αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως παράγοντες της υποδόριας φαιοϋφυομυκητίασης, εξαιτίας της επιδερμικής βλέννας που προάγει την αρχική μικροβλάστηση καθώς αποτελεί ιδανικό περιβάλλον (Abdel-Sater *et al.*, 2016).

Περιστασιακά σπάνιες λοιμώξεις συναντώνται και στους ανθρώπους. Τα ψυχρόαιμα ζώα τα οποία ζουν στη στεριά, όπως τα ερπετά και τα πουλιά, δεν επηρεάζονται ή καλύτερα δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής στοιχεία πως επηρεάζονται. Συμπεραίνεται, ότι τα ζώα με υγρή επιδερμίδα, δηλαδή εκείνα που ζουν σε νερά είναι πιο ευαίσθητα σε μόλυνση από *Exophiala*. Η μελανίνη και η ικανότητα να αφομοιώνουν τα αλκυλοβενζόλια θεωρούνται γενικοί παράγοντες λοιμογόνου δράσης, ωστόσο η θερμοευαισθησία του μύκητα είναι αυτή που τελικώς καθορίζει και τους υποψήφιους ξενιστές. Τα είδη *Exophiala* στα ύδατα του ωκεανού έχουν ως επί το πλείστον μέγιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης κάτω από τους 30 ° C, ενώ εκείνες που μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι τις 33 (-36) ° C βρίσκονται σε ρηχά νερά και είναι αυτή που προσβάλλουν περιστασιακά και τους ανθρώπους (De Hoog *et al.*, 2011).

4.2. Μυκητιάσεις σε Ιχθύες

Το γένος *Exophiala* ανεγέρθηκε από τον Carmichael το 1966 με βάση το *E. salmonis* Carmichael, ένα είδος που προκαλεί συστηματική μόλυνση στην πέστροφα (Uijthof *et al.*, 1997). Κλινικά αυτή η ασθένεια εμφάνισε κρανιακά έλκη και ακανόνιστη κολύμβηση. Ο αιτιολογικός παράγοντας αρχικά ονομάστηκε μύκητας τύπου *Phialophora* αλλά αργότερα ταξινομήθηκε ως *Exophiala salmonis*.

Αργότερα, ο Fijan (1969) ανέφερε μια συστηματική μυκητίαση στο γατόψαρο *Ictalurus punctatus*, με δερματικές εξελκώσεις και πολυάριθμα οζίδια σε όλα τα εσωτερικά όργανα. Ο αιτιολογικός παράγοντας εντοπίστηκε ως μύκητας τύπου *Phialophora*, αλλά αργότερα αναγνωρίστηκε ως *E. pisciphilus* (Munchan *et al.*, 2009). Στη συνέχεια προστέθηκαν δύο επιπλέον παθογόνα είδη στο γένος *Exophiala* στα ψάρια, το *E. pisciphila* και το *E. Psychrophila* καθώς και άλλα είδη από άλλες πηγές πέραν των ιχθύων (Uijthof *et al.*, 1997).

Η ταξινόμηση των ειδών στο γένος *Exophiala* είναι προβληματική λόγω του περιορισμένου αριθμού αξιόπιστων μορφολογικών χαρακτηριστικών (Uijthof *et al.*, 1997), (Abdel-Sater *et al.*, 2016). Τα τελευταία χρόνια τα διαγνωστικά εργαλεία έχουν εστιάσει κυρίως στη μοριακή ταξινόμηση. Η αλληλούχιση των περιοχών εσωτερικής μεταγραφής (ITS) είναι ένα εξαιρετικά αξιόπιστο εργαλείο για την αναγνώριση ειδών στελεχών που σχετίζονται φυλογενετικά με αυτό το είδος μαύρης ζύμης (Abdel-Sater *et al.*, 2016).

Οι μυκητιάσεις σε εκτρεφόμενα ψάρια γλυκού νερού είναι συχνές και προκαλούν μεγάλες θνησιμότητες (Athanasopoulou *et al.*, 1986). Στα θαλασσινά εκτρεφόμενα ψάρια οι μυκητιάσεις είναι σπάνιες και τέτοιες μολύνσεις συνήθως είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν και να εκριζωθούν από την εκτροφή. Τα τελευταία χρόνια μολύνσεις από *Exophiala spp.* έχουν αναφερθεί σε πολλούς θαλάσσιους τελεόστεους οργανισμούς όπως ο σολομός του Ατλαντικού, ο (*Salmo salar L.*) (Otis *et al.*, 1985, Pedersen and Langvad, 1989), στο μπακαλιάρο του ατλαντικού (*Gadus morhua L.*) (Gjessing *et al.*, 2011), στο προσφυγάκι (*Sillaginodes punctata*), στο κοκκάλι (*Pseudocaranx dentex*) (Munchan *et al.*, 2009), στο φαγγρί (*Pagrus pagrus*) (Kolygas *et al.*, 2013), στην ιπόγλωσσα Ατλαντικού (Overy *et al.*, 2015), στη σφυρίδα (*Epinephelus lanceolatus*) (Camus *et al.*, 2015), σε γερμανό (*Siganus rivulatus*), (Abdel-Sater *et al.*, 2016) και στο ψάρι καρδινάλιος (*Paracheirodon axelrodi*), (Řehulka *et al.*, 2017) αλλά και σε χονδριχθύες όπως το σκυλάκι (*Mustelus canis*) το οποίο ασθένησε από *E. pisciphila*, (Marancik *et al.*, 2011).

4.2.1. Μυκητιάσεις σε θαλασσινά εκτρεφόμενα ψάρια από *Exophiala angulospora*

Οι μολύνσεις από *Exophiala spp.* στα ψάρια ενυδρείων και στα εκτρεφόμενα ψάρια καθώς και στα αμφίβια είναι σχετικά συχνές. Η ακριβής εκτίμηση του μεγέθους των επιδημιών της νόσου ήταν δύσκολο να εξακριβωθεί λόγω του σπάνιου και τυχαίου χαρακτήρα των ασθενειών που συνήθως δεν διαγιγνώσκεται ή διαγιγνώσκεται ψευδώς. Παρόλα αυτά υπάρχουν αρκετά περιστατικά αναφοράς κρούσματος από *Exophiala spp.* Και μάλιστα με σοβαρές απώλειες (Overy *et al.*, 2015).

Στα άγρια θαλασσινά ψάρια προκαλούν τόσο επιφανειακές όσο και συστηματικές αλλοιώσεις σε μεγάλη ποικιλία θερμόαιμων και ψυχρόαιμων ειδών συμπεριλαμβανομένου του μπακαλιάρου του Ατλαντικού. Στην πραγματικότητα, τα είδη *Exophiala* συγκαταλέγονται μεταξύ των συνηθέστερα αναφερθέντων παραγόντων συστηματικών μυκητιάσεων στα θαλασσινά ψάρια, αν και οι απομονώσεις αυτών των ειδών από υποστρώματα εκτός ιχθύων όπως χώμα, ιζήματα, κύστεις νηματωδών, ξύλο, φυτικά υποστρώματα, ανθρώπινα μαλλιά και νύχια και πόσιμο νερό υποδηλώνουν ότι είναι ευκαιριακά παθογόνα και όχι υποχρεωτικά παθογόνα των ψαριών (Munchan *et al.*, 2009, Gjessing *et al.*, 2011, Overy *et al.*, 2015).

Μεταξύ των ειδών *Exophiala* που αναφέρθηκαν ότι προκαλούν ασθένεια και θνησιμότητα στα ψάρια είναι τα *E. Pisciphila*, *E. salmonis*, *E. xenobiotica*, *E. angulospora* και ορισμένα είδη που δεν έχουν περιγραφεί επαρκώς. Η εκτροφή υπό τεχνητές συνθήκες φαίνεται να δημιουργεί μια προδιάθεση για μόλυνση από ευκαιριακά μυκητιακά παθογόνα. Για παράδειγμα, οι μυκητιάσεις οφειλόμενες σε *E. Angulospora* και άλλες *Exophiala spp.* έχουν αναφερθεί συχνά σε θαλάσσιους δράκους που έχουν διατηρηθεί σε ενυδρεία από διάφορες τοποθεσίες στις Ηνωμένες Πολιτείες (Gjessing *et al.*, 2011, Overy *et al.*, 2015).

Οι παθολογικές μεταβολές στα ψάρια που έχουν μολυνθεί με *Exophiala* έχουν αναφερθεί ότι χαρακτηρίζονται κυρίως από νέκρωση των μονοπύρηνων λευκοκυττάρων και από φλεγμονή που χαρακτηρίζεται κοκκιωματώδης σε διάφορα είδη ψαριών συμπεριλαμβανομένου του μπακαλιάρου του Ατλαντικού. Οι μυκητιακές ασθένειες συνήθως δεν προκαλούν υψηλές βραχυπρόθεσμες απώλειες, αλλά μπορεί να αποφέρουν υψηλές συσσωρευμένες απώλειες με την πάροδο του χρόνου.

Οι φυλογενετικές αναλύσεις μας δείχνουν ότι η *E. angulospora* είναι γενετικά διακριτή από όλα τα άλλα είδη των *Exophiala* που έχουν μέχρι στιγμής συσχετιστεί με ασθένεια στα ψάρια και μπορούν να ταυτοποιηθούν με αξιοπιστία χρησιμοποιώντας μοριακά μέσα και ιδιαίτερα το γονιδιακό τόπο που αφορά την περιοχή του γονιδίου ITS. Το είδος καλλιεργείται εύκολα και μπορεί εύκολα να ταυτοποιηθεί με βάση τη μορφολογία από τα χαρακτηριστικά τριγωνικά κονίδια (Gjessing *et al.*, 2011).

4.2.2. Μυκητιάσεις σε σολομό του Ατλαντικού από *Exophiala salmonis* και *Exophiala psychrophila*

Ένα βασικό χαρακτηριστικό δείγμα μόλυνσης στο σολομό του Ατλαντικού από *Exophiala salmonis* είναι η παρουσία χρόνιων κοκκιωμάτων (Richards *et al.*, 1978, Otis *et al.*, 1985). Μεταξύ των πρώτων αναφορών για μολύνσεις που προκλήθηκαν από μελανόμορφους μύκητες ήταν αυτές του Reichenbach-Klinke (1956). Ο Carmichael (1966) εισήγαγε το γένος *Exophiala* με αναφορά του *E. Salmonis* από εγκεφαλικές βλάβες στην πέστροφα (*Salmo clarkii*). Οι λοιμώξεις από αυτό το είδος έλαβαν επανειλημμένα επιζωοτικό χαρακτήρα με θνησιμότητα έως και 40% σε εκκολαπτήρια στο Calgary του Καναδά, όπου τα ψάρια καλλιεργούνταν σε νερό που προέρχονταν από υπόγειες πηγές θερμοκρασίας 12-14 ° C.

Επίσης, έχουμε περιγραφές από σπλαχνικές μολύνσεις στον σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) μετά τη μεταφορά των καναδικών εκκολαπτηρίων σε ένα κέντρο υδατοκαλλιέργειας (Otis *et al.*, 1985). αναφέρθηκαν επιζωοτίες που εμφανίστηκαν επί αρκετά χρόνια στον σολομό Ατλαντικού εκτροφής (*Salmo salar*) στη Νορβηγία. Θνησιμότητες έως 50% προκλήθηκαν από το είδος *Exophiala psychrophila*. Οι λοιμώξεις έλαβαν χώρα όταν τα ιχθίδια μεταφέρθηκαν στο θαλασσινό νερό, οδηγώντας σε νεφρική κοκκιωματώδη φλεγμονή (Pedersen and Langvad 1989). Ίδιες παθολογίες που συνδέονται με σπλαχνική συμπτωματολογία περιγράφηκαν και στη Σκωτία, αλλά αποδόθηκε στο είδος *Exophiala salmonis* (Richards *et al.*, 1978).

Μετά από μικροσκοπική εξέταση που έγινε στις παραπάνω περιπτώσεις, παρουσιάστηκαν διαφορές ως προς την ταυτοποίηση των ειδών *Exophiala spp.* Πρώτος, ο Carmichael (1966) ο οποίος εισήγαγε το γένος *Exophiala*, παρατήρησε κατά την εξέταση σε δείγμα, ότι τα κονίδια τα οποία παρήχθησαν είχαν σφαιρικό σχήμα και είχαν την τάση να συσσωρεύονται στις κορυφές. Επιπροσθέτως, ένα ακόμα χαρακτηριστικό γνώρισμα του είδους ήταν η παρουσία γιγαντιαίων κυττάρων και πιθανώς σχηματίστηκαν με σύντηξη μακροφάγων, μαζί με την παρουσία κυττάρων με έντονη ηωσινοφιλική φλεγμονή. Ο μύκητας αναγνωρίστηκε ως *Exophiala salmonis* Carmichael (Otis *et al.*, 1985).

Ενώ, οι Pedersen and Langvad (1989) στην περίπτωση μυκητίασης από *Exophiala psychrophila*, παρατήρησαν ότι, τα κονίδια διαφέρουν ως προς το μέγεθος και τη μορφή και μπορεί να έχουν ουλές απόσχισης σε σχέση με τα κονίδια από *Exophiala salmonis* χωρίς όμως το σχήμα των κονιδίων να εμφανίζει ετερογένεια τόσο στο σχήμα όσο και στο μέγεθος. Κατά συνέπεια, τα κριτήρια αυτά έχουν περιορισμένη αξία για τη διάκριση μεταξύ αυτών των ειδών. Το *Exophiala salmonis* έχει διάσπαστα κονίδια τα οποία είναι μεγαλύτερα από αυτά των άλλων ειδών, καθιστώντας δυνατό τον διαχωρισμό του είδους αυτού από τα άλλα, με βάση μόνο αυτό το μορφολογικό κριτήριο.

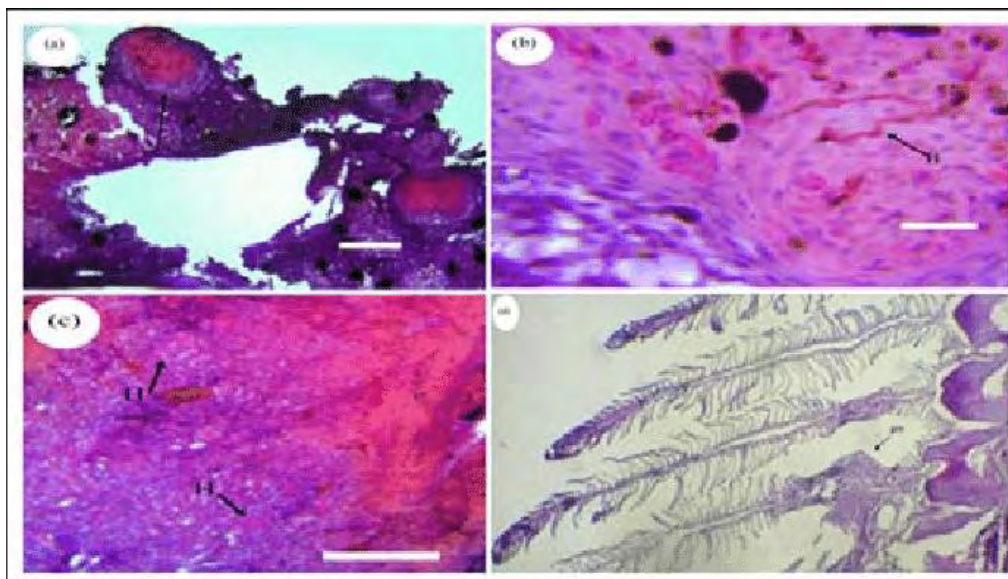
Επίσης, η εμφάνιση των αποικιών σε άγαρ είναι ένα άλλο κριτήριο που χρησιμοποιείται συχνά για την περιγραφή των μυκήτων. Ωστόσο, οι αποικίες των ειδών *Exophiala* ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του χρησιμοποιούμενου μέσου, το πόσο πρόσφατα παρασκευάστηκε το μέσο και τη θερμοκρασία επώασης του στελέχους.

Ως εκ τούτου, για την περιγραφή της αποικίας για την αναγνώριση των ειδών *Exophiala* πρέπει να υπάρχει ακριβής αναφορά στον τύπο του χρησιμοποιούμενου μέσου, επίσης στο χρόνο αποθήκευσης του μέσου, στη θερμοκρασία και στο χρόνο επώασης.

4.2.3. Εμφάνιση του *Exophiala xenobiotica* σε εκτρεφόμενα και μη ψάρια

Οι φαιοϋδρομυκητιάσεις που προκλήθηκαν από *Exophiala spp.* έχουν αναδυθεί ως ένα αυξανόμενο πρόβλημα σε ποικιλόθερμα σπονδυλωτά αλλά και περιστασιακά σε ασπόνδυλα. Η νόσος οφείλεται κυρίως στα ψυχρόφιλα μέλη του ταξινομικού κλάδου που ανήκει στο *E. Salmonis* (*E. Salmonis*, *E. pisciphila*, *E. psychrophila* και *E. aquamarina*) και σε μια εξωτερική ομάδα ανεξάρτητη του παραπάνω ταξινομικού κλάδου (*E. angulospora*). Αντιπρόσωποι του ταξινομικού κλάδου που καθορίζει το είδος *E. Jeanselmei*, συμπεριλαμβανομένων των *E. jenselmei* και *E. lecanii corni*, εμφανίζονται πιο συχνά στα εκτοθερμικά σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων μιας και τα είδη αυτά είναι θερμόφιλα (Camus *et al.*, 2015).

Το *Exophiala xenobiotica* μέλος της ομάδας *Jeanselmei* με ελαφρώς μελανόμορφα κονιδιογόνα κύτταρα, περιγράφηκε αρχικά το 2006 και είναι σχετικά συχνή αιτία ήπιας δερματικής μόλυνσεως στους ανθρώπους. Τα περιβαλλοντικά στελέχη έχουν το ασυνήθιστο χαρακτηριστικό να αποικούν σε περιοχές πλούσιες σε πτητικούς μονοαρωματικούς υδρογονάνθρακες και αλκάνια. Η μυκητίαση από αυτό το είδος έχει αναφερθεί σε εκτρεφόμενους, αλλά και σε άγριους πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί μόλυνση από *Exophiala xenobiotica* σε άγριο είδος σφυρίδας (*Epinephelus lanceolatus*), (Camus *et al.*, 2015) και γερμανού (*Siganus rivulatus*), (Εικ.4.2.3.1.), (Abdel-Sater *et al.*, 2016).

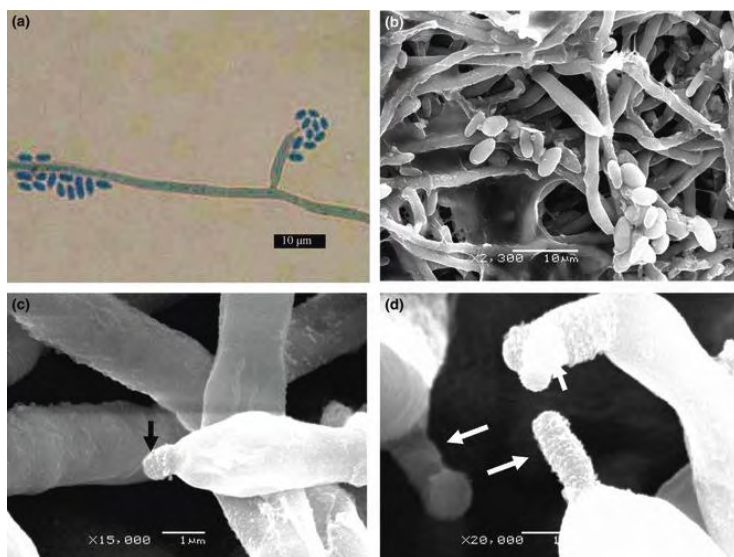


Εικόνα 4.2.3.1. α)κοκκιωματώδης φλεγμονή νεφρού από *Exophiala xenobiotica* στο γερμανό (*Siganus rivulatus*), b,c) υφές μυκήτων (βέλη), d) προσβολή των βραγχίων (Πηγή: Abdel-Sater *et al.*, 2016)

Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί μόνο μία φορά μαζικός θάνατος σε εκτρεφόμενα κοκκάλια (*Pseudocaranx dentex*), στην Ιαπωνία, μετά από συστηματική λοίμωξη. Η συνολική θνησιμότητα ήταν περίπου 8,6% εντός ενός μηνός. Μικροσκοπική εξέταση των νεφρών των δειγμάτων εμφάνισε πολυάριθμες διαφραγματικές υφές, ανοικτού καφέ χρώματος. Παρόμοια εικόνα εμφανίστηκε σε ιστολογικές τομές καρδιακού μυ και βραγχίων (Munchan *et al.*, 2009).

Η μορφολογία του είδους *Exophiala xenobiotica*, (Εικ.4.2.3.2.) διαφέρει από τα άλλα είδη *Exophiala* που περιγράφηκαν προηγουμένως. Η διαφορά βρίσκεται στο μέγεθος του κονιδίου και στην θερμοκρασία ανάπτυξης. Το είδος αυτό αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 30- 35 °C και τα κονίδια του έχουν κωνικό σχήμα.

Ωστόσο, τα κριτήρια αυτά είναι περιορισμένης αξίας για τη διάκριση μεταξύ των ειδών. Όλα τα μορφολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά, μαζί με τα μοριακά δεδομένα, είναι απαραίτητα για τον ταξινομικό διαχωρισμό του μύκητα (Munchan *et al.*, 2009).



Εικόνα 4.2.3.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Exophiala xenobiotica* (Πηγή: Munchan *et al.*, 2009)

4.2.4. *Exophiala pisciphila* σε ζώα υπό αιχμαλωσία σε ενυδρεία

Υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός αναφορών περιπτώσεων που περιγράφουν μυκητιακές λοιμώξεις στα ελασμοβράγχια. Το είδος *Exophiala pisciphila* έχει περιγραφεί στο δέρμα και στον εγκέφαλο σε σκυλάκι (*Mustelus canis*) ηλικίας 5 μηνών και σε καρχαρία ζέβρα (*Tegostoma fasciatum*).

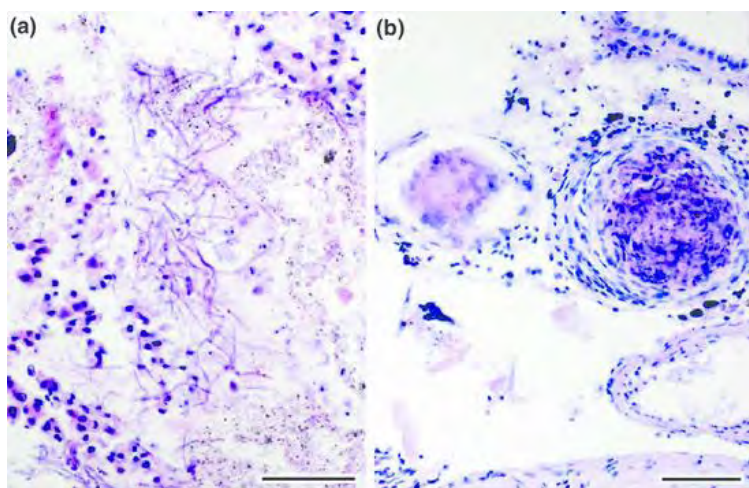
Η ανοσοποιητική κατάσταση είναι δύσκολο να αξιολογηθεί στα ελασμοβράγχια λόγω της έλλειψης πληροφοριών σχετικά με την ταξινόμηση και τη λειτουργία των ανοσοκυττάρων.

Δεδομένου ότι πολλοί μύκητες είναι παρόντες στο νερό και στο έδαφος, συχνά θεωρείται ότι συμπεριφέρονται ως δευτερογενείς ευκαιριακοί εισβολείς μετά από ενέσιμους εμβολιασμούς, τραυματισμούς, από βακτηριακή, ιική και παρασιτική ασθένεια ή από ανοσοκαταστολή που προκαλείται από περιβαλλοντικούς ή μη παράγοντες καταπόνησης (π.χ. ακατάλληλη θερμοκρασία νερού, κακή ποιότητα νερού, υπερβολικός χειρισμός), συχνά θεωρούνται παράγοντες που συμβάλλουν (Marancik *et al.*, 2011).

Για πρώτη φορά βρέθηκε το στέλεχος του μύκητα *Exophiala pisciphila* σε ενυδρείο γλυκού νερού, στο ψάρι καρδινάλιος (*Paracheirodon axelrodi*), σε δημόσιο ενυδρείο στην Τσεχία.

Στη περίπτωση αυτή ο τόπος εντοπισμού και ανάπτυξης του μυκηλίου ήταν η γαστρεντερική οδός (Εικ.4.2.4.1.), από την οποία τα κονίδια διαδόθηκαν αιματογενώς από το εντερικό επιθήλιο στα υπόλοιπα σπλαχνικά όργανα.

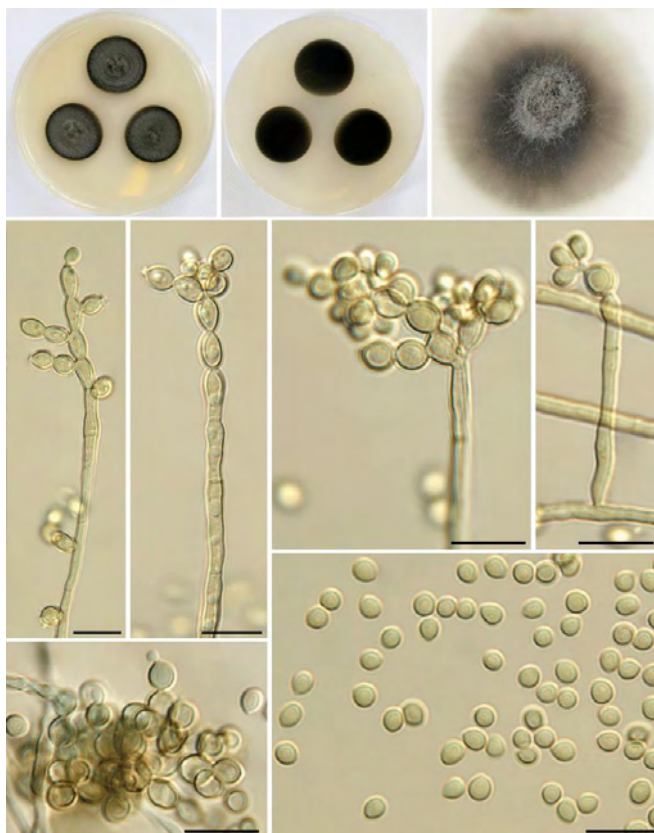
Δεν υπάρχει σαφής εξήγηση σχετικά με το εάν η πηγή της λοίμωξης ήταν εξωγενής ή ενδογενής. Η συνεχής κατάποση των σπόρων ή των υφών από μολυσμένη τροφή, μπορεί να αποτελούσε μια πιθανή εξωγενής πηγή μόλυνσης. Είναι επίσης γνωστό ότι μερικά είδη *Exophiala spp.* μπορούν να σχηματίσουν μεγάλες μάζες από υφές σε τεχνητό υδάτινο περιβάλλον όπως πισίνες και σωλήνες νερού. Αυτές οι μάζες θα μπορούσαν να είναι μια πιθανή πηγή μόλυνσης σε ενυδρεία, αλλά τέτοιες μάζες δεν είχαν παρατηρηθεί στη προκειμένη περίπτωση. Το πιθανότερο σενάριο θεωρήθηκε ο συνδυασμός της ανοσοανεπάρκειας και της ηλικίας του ζώου (Řehulka *et al.*, 2017).



Εικόνα 4.2.4.1. Μόλυνση στο *Paracheirodon axelrodi* που προκαλείται από *Exophiala pisciphila* (Πηγή: Řehulka *et al.*, 2017)

Η μορφολογική αναγνώριση του *Exophiala spp.* είναι δυσχερής λόγω της απλής και αλληλεπικαλυπτόμενης μορφολογίας των διαφόρων στοιχείων του μήκυτα. Μερική διαφοροποίηση των ειδών μπορεί να επιτευχθεί λαμβάνοντας υπόψη διάφορες παραμέτρους όπως: ο χρόνος ανάπτυξης υπό ειδικά θρεπτικά υποστρώματα σε σταθερές θερμοκρασίες, η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και οι διαστάσεις των κονιδίων. Παρατηρούνται μη διακλαδισμένα ή αραιά διακλαδισμένα κονιδιοφόρα σε πλευρική και τελική θέση επί των υφών. Επίσης, βλέπουμε συστάδες εκκολαπτικών κυττάρων και κονιδίων, όπου τα κονίδια είναι ελεύθερα (Εικ.4.2.4.2.).

Ωστόσο, παρατηρείται και συσχέτιση μεταξύ της μέγιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης και του φυσικού ενδιαιτήματος του ξενιστή. Τα είδη που προέρχονται από το «*Salmonis clade*» και αποτελούν τους κύριους παράγοντες λοιμώξεων σε ψυχρόαιμα ζώα και φυσικώς κατανεμημένα σε κρύα νερά δεν αναπτύσσονται στους 37 ° C, ενώ τα είδη από *clades* που συσχετίζονται με συστηματικές λοιμώξεις στον άνθρωπο αναπτύσσονται καλά στους 37 ° C. Η αλληλουχία DNA των πυρηνικών περιοχών του ριβοσωμικού DNA ή αρκετών άλλων τύπων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θεωρείται απαραίτητη για την αξιόπιστη αναγνώριση εντός συμπλεγμένων ειδών.



Εικόνα 4.2.4.2. Μακρομορφολογία και μικρομορφολογία *Exophiala pisciphila* (Πηγή: Řehulka *et al.*, 2017)

4.3. Μυκητιακή μόλυνση από *Exophiala werneckii* σε παστωμένα ψάρια

Το πάστωμα είναι μια διαχρονική διαδικασία συντήρησης των αλιευμάτων. Ωστόσο, τα αλατισμένα τρόφιμα δεν είναι εντελώς απαλλαγμένα από μικροβιακή μόλυνση. Έχουν αναφερθεί διάφοροι αλόφιλοι μύκητες και βακτήρια που απομονώνονται από παστωμένα τρόφιμα συμπεριλαμβανομένων των *Micrococcus morrhuae*, *Halobacterium sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Sporendonema expizoum*, *Aspergillus glaucus* και *A. echinulatus*.

Το *Exophiala werneckii* ανακτήθηκε από αλλοιωμένα παστωμένα ψάρια και είναι η μόνη φορά όπου ένα είδος του γένους *Exophiala* αναφέρεται ως ένα αλοφιλικό σαπρόφυτο, υπεύθυνο για την αλλοίωση τροφίμων υπό πάστωση. Με βάση τη μακρο-και μικρομορφολογία τους, τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *E. Werneckii*. Τα κονίδια τους φέρουν προεξέχοντα,επάρματα σε τερματικές θέσεις επί των υφών (Mok *et al.*, 1981).

Κεφάλαιο 5°

Πειραματικό μέρος

5.1. Υλικά και μεθοδολογία

Προέλευση Αιθέριων ελαίων: Η αγορά των καθαρών αιθέριων ελαίων έγινε από την APIVITA (Εικ.5.1.1.). Τα αιθέρια έλαια διατηρήθηκαν σε πωματισμένα σκουρόχρωμα φιαλίδια σε θερμοκρασία ψύξης έως τη χρησιμοποίησή τους.



Εικόνα 5.1.1. Αιθέρια έλαια (Πηγή: <https://atpharmacy.gr>)

Προέλευση Μυκητιακού στελέχους: Το μυκητιακό στέλεχος ανήκει στο γένος *Exorhiala* *sp.* και προήλθε από το εργαστήριο Ιχθυολογίας, Παθολογίας Υδρόβιων οργανισμών και Υδατοκαλλιεργειών του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επί της ουσίας αποτελεί ανακαλλιέργεια του στελέχους που απομονώθηκε το 2013 από φαγκριά εκτροφής μετά από μαζική μόλυνση τους από τον παθογόνο παράγοντα. Έκτοτε ο μύκητας διατηρούνταν σε SDA (Sabouraux Dextrose Agar) στους 10°C, και ανακαλλιεργούνταν ενοφθαλμιζόμενος μηνιαίως (Εικ. 5.1.2.).



Εικόνα 5.1.2. Διατήρηση του μύκητα σε SDA (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Έλεγχος αντιμυκητιακής δράσης: Για τον έλεγχο της αντιμυκητιακής δράσης επιλέχθηκαν πέντε (5) διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε έλαιο (100, 200, 400, 800 και 1600μg/ml). Η εφαρμογή των ελαίων έγινε με διάλυση τους σε όλο τον όγκο PDA θρεπτικού υποστρώματος (Potato Dextrose Agar). Για να αποφευχθεί η πιθανότητα δημιουργίας διφασικού συστήματος μεταξύ του αιθέριου ελαίου και του άγαρ, όλα τα αιθέρια έλαια πριν από τη τελική ανάμειξη τους με αυτό, μετατρέπονταν σε γαλακτώματα αναμειγνύόμενα με 100mg λεκιθίνη (LAB MC041). Μετά την ανάμειξη του γαλακτώματος και του άγαρ, ακολουθούσε ήπια θέρμανση (50⁰C) με ανάδευση για 10min. Για ισχυροποίηση της στατιστικής βάσης, κάθε συγκέντρωση ελαίου ξεχωριστά εφαρμόστηκε σε 10 τρυβλία Petri (9 βαθμοί ελευθερίας), (350 τρυβλία) (Εικ.5.1.3.).



Εικόνα 5.1.3. Προετοιμασία τρυβλίων Petri (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

Εκτός από τα παραπάνω ετοιμάστηκαν και (3x10) τρυβλία που περιείχαν PDA (+100mg Lecithin), PDA 3%NaCl (+100mg Lecithin) και PDA 5% NaCl (+100mg Lecithin), με σκοπό να διερευνηθεί η βέλτιστη ανάπτυξη του μύκητα συναρτήσει της αλατότητας.

10 ημέρες πριν την έναρξη του πειράματος έγινε σπορά σε φιαλίδιο που περιείχε 3ml PDB (Potato Dextrose Broth). Την ημέρα της έναρξης του πειράματος διαχωρίστηκαν τα μυκήλια από τα κονίδια με χρήση αποστειρωμένου μικροφίλτρου (70μm Nylon Mesh, Fisher Scientific). Ο ενοφθαλμισμός γινόταν στο γεωμετρικό κέντρο του κάθε τρυβλίου με τη βοήθεια μικροπιπέτας, μεταφέροντας 15μl από το PDB που περιείχε τα κονίδια. Πριν από κάθε ενοφθαλμισμό σε νέο τρυβλίο γινόταν ανάδευση του PDB.

Υπολογισμός αντιμυκητιακής δράσης: Για τον υπολογισμό της αντιμυκητιακής δράσης του κάθε αιθέριου ελαίου, έγινε επώαση για 6 εβδομάδες στους 22°C (Εικ.5.1.4.). Διενεργήθηκαν συνολικά 6 εβδομαδιαίες μετρήσεις της διαμέτρου της κάθε αποικίας/ τρυβλίο με τη βοήθεια μικρομέτρου (Εικ.5.1.5.). Ο υπολογισμός της αντιμυκητιακής

δράσης εκφράστηκε ως ποσοστό αναστολής ανάπτυξης της αποικίας του μύκητα χρησιμοποιώντας τον τύπο σύμφωνα με τους Pandey *et al.* 1982, όπου:

$$\text{Ποσοστό αναστολής \%} = 100 (dc - dt)/dc, \text{ με}$$

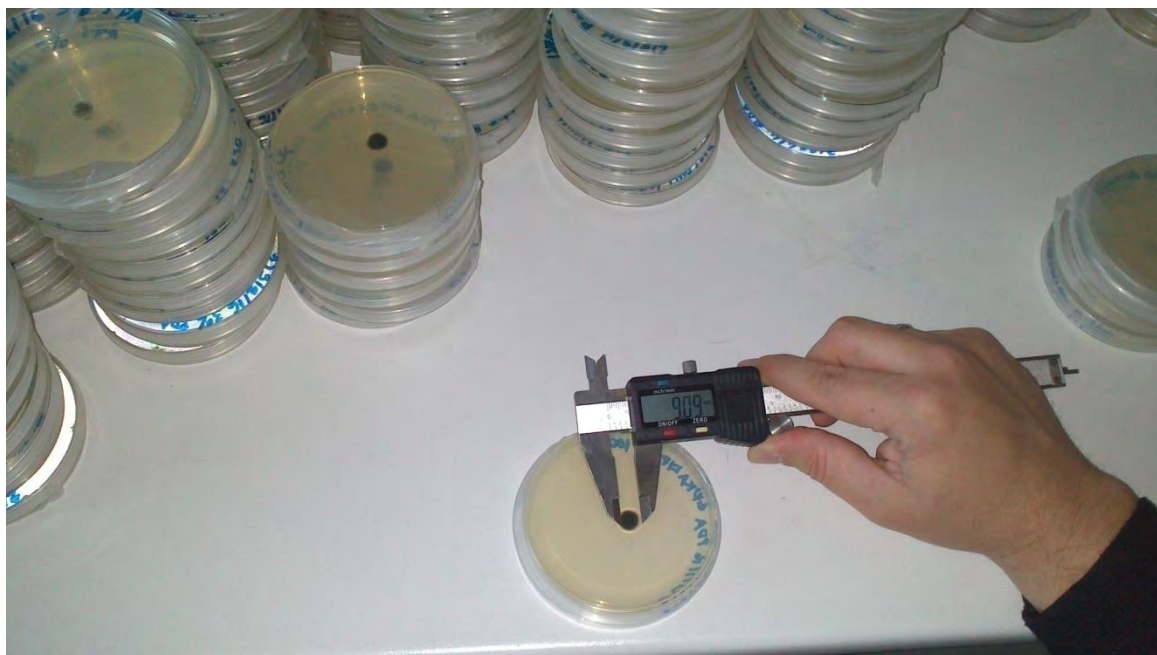
dc = Μέση Διάμετρος της αποικίας του μάρτυρα, και

dt = Μέση Διάμετρος της αποικίας της υπό έλεγχο ομάδας

Ως μάρτυρας επιλέχθηκε μια ομάδα εκ των τριών: 1)PDA+Lecithin, 2) PDA 3%NaCl+Lecithin και 3)PDA 5%+ Lecithin, η οποία παρουσίασε την μεγαλύτερη μέση ανάπτυξη αποικίας με σημαντικά στατιστική διαφορά, στο τέλος του πειράματος (6^η εβδομαδιαία μέτρηση).



Εικόνα 5.1.4. Τοποθέτηση των τρυβλίων στο θάλαμος επώασης (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)



Εικόνα 5.1.5. Μετρήσεις της διαμέτρου της κάθε αποικίας/ τρυβλίου με τη βοήθεια μικρομέτρου (Πηγή: Προσωπικό αρχείο)

5.2. Αποτελέσματα

Στην Ελλάδα, η μόνη καταγεγραμμένη μυκητίαση σε θαλασσινά ψάρια από *Exophiala* sp. αναφέρθηκε το 2013, σε μονάδα εκτροφής φαγκριού (*Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758), στο Βόρειο Αιγαίο (Kolygas *et al.*, 2013).

Τριάντα πέντε φαγκριά (*Pagrus pagrus*) που προέρχονταν από μονάδα εκτροφής ευρύαλων ειδών του Βορείου Αιγαίου μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας (Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) και φιλοξενήθηκαν σε 2 ενυδρεία 250 L με παροχή οξυγόνου. Τα ψάρια αποτελούσαν υποκείμενα δειγματοληψίας από ιχθυοκλωβό όπου εκτρέφονταν συνολικά 70.000 φαγκριά και τα οποία εμφάνιζαν συνεχιζόμενη θνησιμότητα της τάξης των 50-100 ψαριών/ημέρα. Τα ιχθύδια με μέσο βάρος 17 g, εκτρέφονταν σε ιχθυοκλωβούς και προέρχονταν από ιχθυογεννητικό σταθμό της περιοχής. Σε όλα τα ψάρια διενεργήθηκαν μικροβιολογικές, παρασιτολογικές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις (Kolygas *et al.*, 2013).

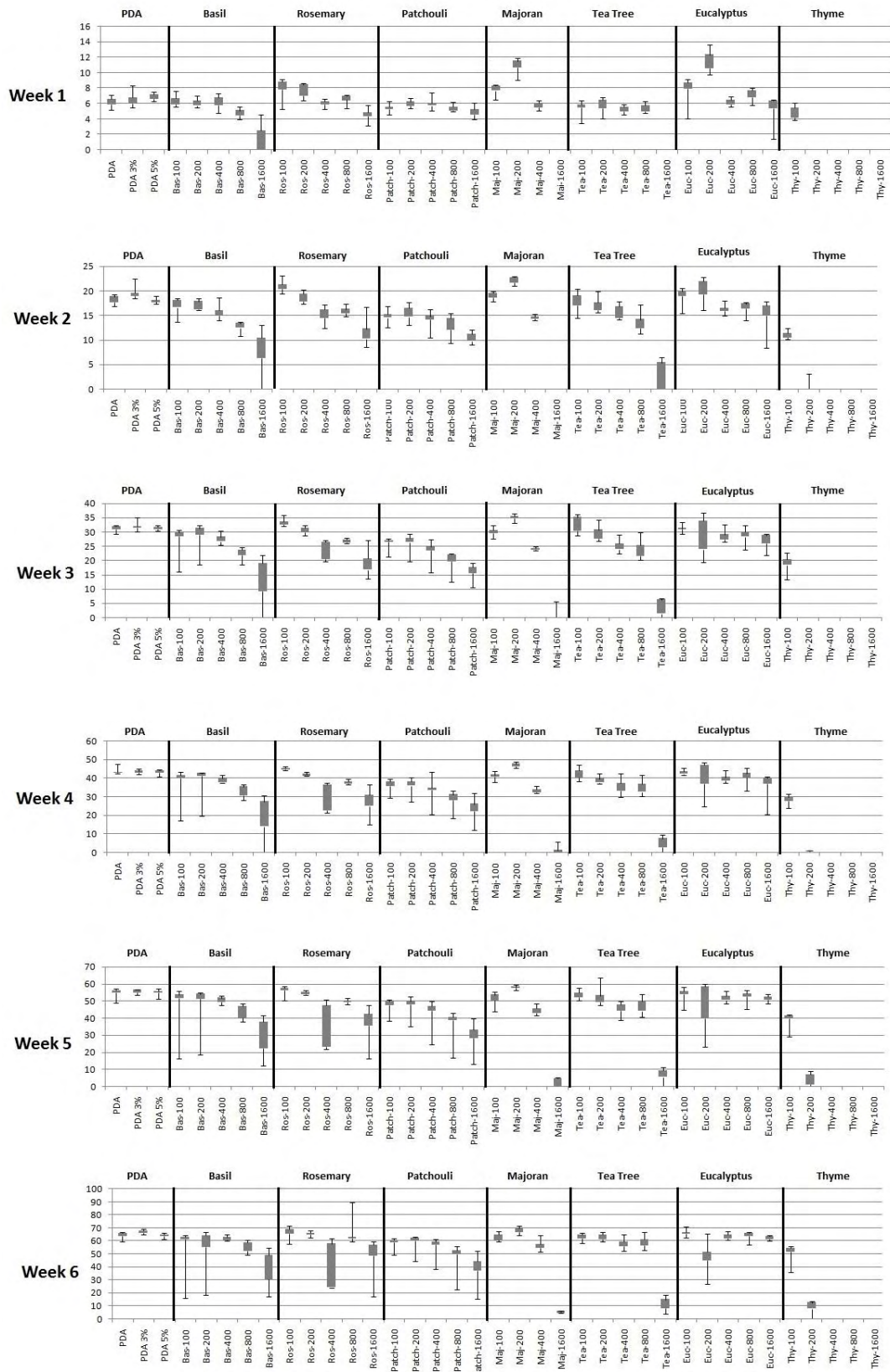
Το μυκητιακό στέλεχος που χρησιμοποιήσαμε για την διενέργεια του πειράματος μας ανήκει στο γένος *Exophiala* sp. Επί της ουσίας αποτελεί ανακαλλιέργεια του στελέχους από φαγκριά εκτροφής μετά από μαζική μόλυνση τους. Έκτοτε ο μύκητας

διατηρούνταν σε SDA (Sabouraux Dextrose Agar) στους 10⁰C, και ανακαλλιεργούνταν ενοφθαλμιζόμενος μηνιαίως.

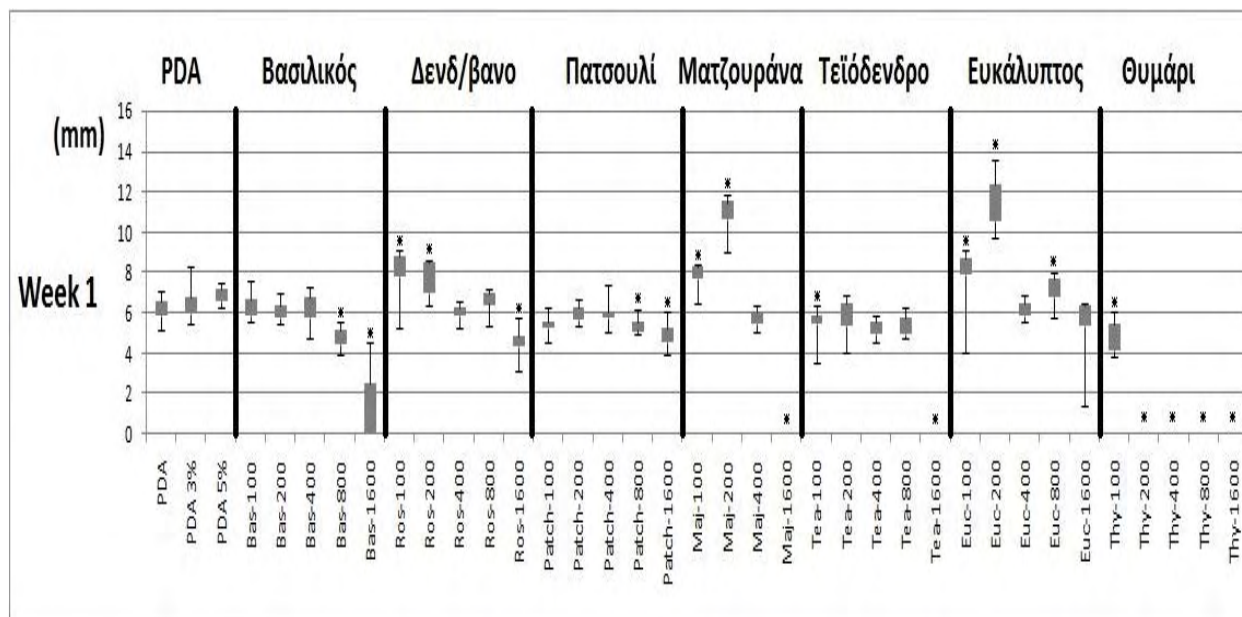
Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων έναντι αρκετών παθογόνων παραγόντων των ψαριών έχει μελετηθεί αρκετά και έχει αποδειχθεί με πολλές μελέτες (Yiagnisis *et al.*, 2008). Για το λόγο αυτό η παρούσα εργασία εξετάζει τη πιθανή αντιμυκητιακή δράση επτά (7) διαφορετικών αιθέριων ελαίων 1) Τειϊόδεντρου, *Malaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher, 1905) Cheel, 1925, 2) Ευκαλύπτου, *Eucalyptus globulus* Labillardiere, 1804, 3) Βασιλικού, *Ocimum basilicum* Linnaeus, 1753, 4) Ματζουράνας, *Origanum majorana* Linnaeus, 1753, 5) Πατσουλίου, *Pogostemon cablin* Benth, 1848, 6) Δενδρολίβανου, *Rosmarinus officinalis* Linnaeus, 1753 και 7) Θυμαριού, *Thymus vulgaris* Linnaeus, 1753.

Παρακάτω βλέπουμε τα συνολικά αποτελέσματα των μετρήσεων και των 6 εβδομάδων (Πίνακας 1) και στη συνέχεια θα γίνει σχολιασμός των αποτελεσμάτων κάθε εβδομάδας ξεχωριστά.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα μετρήσεων 6 εβδομάδων



Στο παρακάτω διάγραμμα έχουμε συγκεντρωμένα τα αποτελέσματα της 1^{ης} Εβδομάδας για τα επτά βασικά αιθέρια έλαια μαζί με τα υποστρώματα-μάρτυρες (Εικ.5.2.1.). Οι αριθμοί που βλέπετε αριστερά στην κάθετη στήλη είναι η διάμετρος της κάθε αποικίας σε mm, ενώ στην οριζόντια στήλη είναι οι συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν, για παράδειγμα βασιλικός 100-200-400-800 και 1600ppm, δενδρολίβανο 100-200-400-800 και 1600ppm κοκ.



Εικόνα 5.2.1. Αποτελέσματα 1^{ης} εβδομάδας

Σε ότι αφορά τους μάρτυρες, βέλτιστη τιμή Μέσου Όρου ανάπτυξης παρουσίασε ο μύκητας που ενοφθαλμίστηκε στη ομάδα τρυβλίων που περιείχαν PDA 3% NaCl, με σημαντική στατιστική διαφορά (One way ANOVA $P=0,0015<0,05$). Επιπλέον διενεργήθηκε περαιτέρω έλεγχος t, δύο δειγμάτων μεταξύ PDA-PDA 3% ($P=0,009<0,05$), PDA-PDA 5% ($P=0,562>0,05$) και PDA 3%-PDA 5% ($P=0,0001<0,05$), όπου και επαληθεύθηκε η παραπάνω υπόθεση. Μεταφραστικά η ανάπτυξη του παρόντος μυκητιακού στελέχους είναι βέλτιστη σε συγκέντρωση NaCl 3% και μάλιστα με στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι των συγκεντρώσεων 0% και 5% NaCl. Για το λόγο αυτό ως μάρτυρας σύγκρισης επιλέχθηκε η Μέση Διάμετρος ανάπτυξης του PDA 3% NaCl. Πίνακας 2.

**Πίνακας 2. Μέση διάμετρος
ανάπτυξης**

	Μέση Διάμετρος (mm)
PDA	64,66 ± 2,25
PDA 3%	67,06 ± 1,28
PDA 5%	64,16 ± 1,36

Την πρώτη εβδομάδα δεν υπήρξε σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των PDA, εκτός από τη ματζουράνα 200 ppm και ευκάλυπτος 200 ppm, επιτάχυναν την ανάπτυξη του μύκητα κατά 56% σε σχέση με το pda 3%, το οποίο ήταν ένα αποτέλεσμα απρόσμενο.

Επιπροσθέτως, την πρώτη εβδομάδα ορισμένα αιθέρια έλαια που κατέστειλαν την ανάπτυξη του μύκητα. Με μια πρώτη ματιά βλέπουμε πως σε υψηλές συγκεντρώσεις (800 ppm και 1600 ppm) έχουμε μια στατιστικά σημαντική καταστολή στην ανάπτυξη του μύκητα, όχι όμως για όλα τα έλαια. Επίσης, αν ρίξουμε μια ποιο προσεκτική ματιά θα δείτε για παράδειγμα πως στο πατσουλί αν και με ισχυρή σημαντικότητα η μέση τιμή στα 800 ppm και στα 1600 ppm είναι κοντά στο μέσο όρο ανάπτυξης του PDA3%. Για τον δε Ευκάλυπτο δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ακόμη και στα 1600ppm.

Στη πραγματικότητα, από τη πρώτη κιόλας εβδομάδα τα περισσότερα αιθέρια έλαια κατέδειξαν πως δεν είναι ικανά να αντιμετωπίσουν τον μύκητα σε συγκεντρώσεις όπου μια πραγματική per os εφαρμογή τους σε ψάρια θα μπορούσε να είναι ρεαλιστική και οικονομικά αποδεκτή. Παρόλα αυτά η ματζουράνα στα 1600 ppm και το τειόδεντρο στα 1600 ppm κατέστειλαν πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα, αν και τέτοιες συγκεντρώσεις κινούνται οριακά σε μια οικονομικά ρεαλιστική εφαρμογή σε ψάρια.

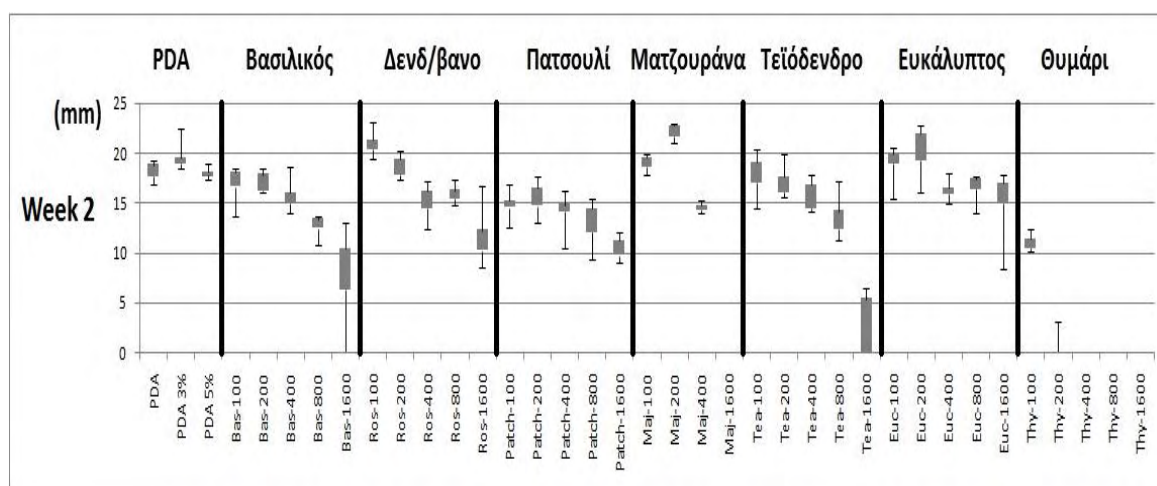
Όμως το αιθέριο έλαιο θυμαριού φάνηκε γρήγορα πως αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα περιορισμού και ίσως καταστολής του μύκητα. Ακόμη και σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 100 ppm περιορίζει την ανάπτυξη ενώ στα 200 ppm την καταστέλλει πλήρως.

Συμπερασματικά, μετά από μια εβδομάδα επώασης του μύκητα μπορούμε να πούμε πως Δενδρολίβανο, Ματζουράνα και Ευκάλυπτος σε χαμηλές συγκεντρώσεις εφαρμογής (100, 200 ppm), επιταχύνουν σημαντικά την ανάπτυξη του μύκητα, ενώ στον αντίποδα Ματζουράνα και τειόδενδρο στα 1600 ppm καθώς επίσης και θυμάρι από τα

200 ppm και πάνω αποτέλεσαν μοναδικές υποψήφιες συγκεντρώσεις για πιθανή χρήση τους ενάντια στον μύκητα του γένους *Exophiala*.

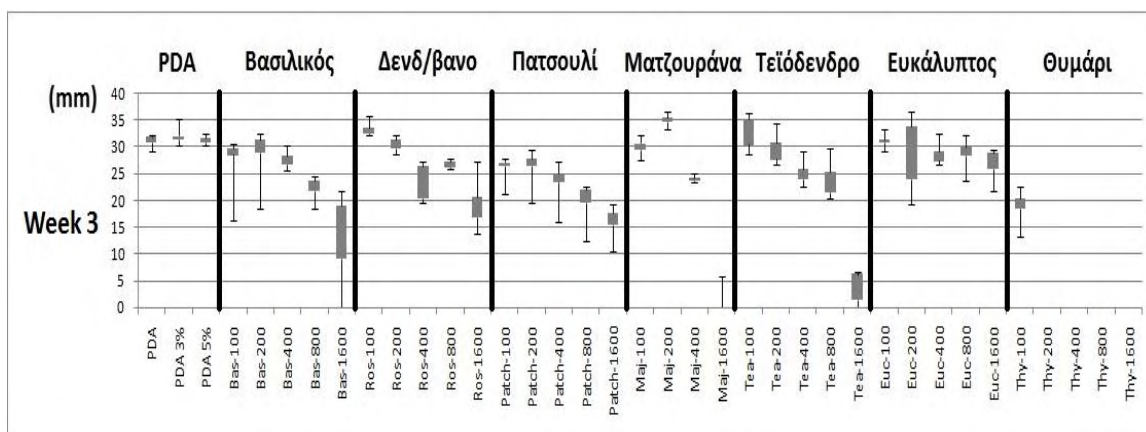
Εδώ έχουμε συγκεντρωμένα τα αποτελέσματα της 2^{ης} Εβδομάδας (Εικ.5.2.2.) για τα επτά βασικά αιθέρια έλαια μαζί με τα υποστρώματα-μάρτυρες. Τα μοτίβα ανάπτυξης του μύκητα αναπροσαρμόζονται με τη πάροδο του χρόνου, και πως τα επίπεδα σημαντικότητας της πρώτης εβδομάδας συγκριτικά με εκείνα της δεύτερης θα τροποποιούνταν εξαιτίας της ενεργοποίησης των μηχανισμών αντι-σοκ που διαθέτουν οι μύκητες.

Εντούτοις τα αποτελέσματα δεν άλλαξαν δραματικά. Στη πραγματικότητα δεν άλλαξαν καθόλου πέραν της επιταχυνόμενης αύξησης των μυκήτων στα υποστρώματα των μαρτύρων (όπως και των τριών χαμηλών συγκεντρώσεων του δενδρολίβανου, της ματζουράνας και του ευκαλύπτου) σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα. Τα νέα δεδομένα της 2^{ης} εβδομάδας ήταν η ανάπτυξη του μύκητα στο έλαιο τειοδένδρου στα 1600 ppm. Επίσης σε 1 από τα 10 τριβλύα παρατηρήθηκε μικρή ανάπτυξη του μύκητα.



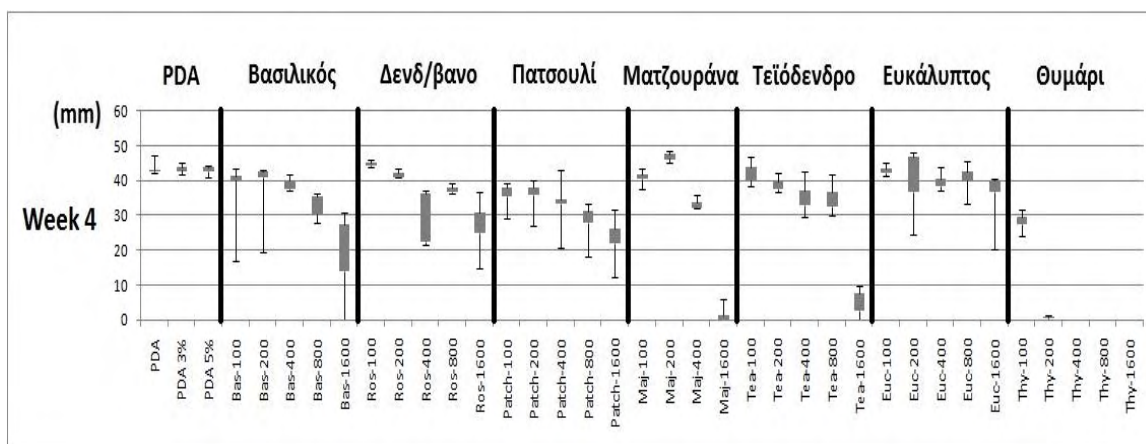
Εικόνα 5.2.2. Αποτελέσματα 2^{ης} εβδομάδας

Στην 3η εβδομάδα (Εικ.5.2.3.) φάνηκε πως η ενεργοποίηση των μηχανισμών αντι-σοκ λειτούργησαν έναντι των χαμηλών συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου Τειοδένδρου στα 100 & 200 ppm με σημαντική στατιστική διαφορά. Επίσης παρατηρήθηκε μικρή ανάπτυξη του μύκητα σε 2 τριβλύα με έλαιο ματζουράνας στα 1600ppm



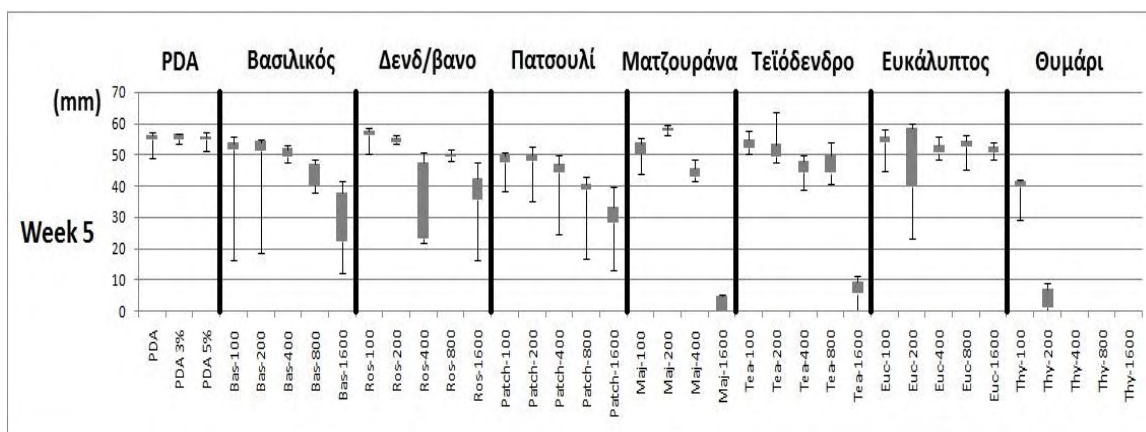
Εικόνα 5.2.3. Αποτελέσματα 3^{ης} εβδομάδας

Στην 4η εβδομάδα (Εικ.5.2.4.) η ενεργοποίηση των μηχανισμών αντι-σοκ φαίνεται πως λειτούργησαν έναντι των υποστρωμάτων που περιείχαν κατασταλτικές συγκεντρώσεις ή αλλιώς συγκεντρώσεις-σοκ για τον μύκητα. Παρατηρείστε πως σε όλα τα κυβογράμματα όσο πιο χαμηλά βρίσκεται το 50% των τιμών, τόσο μεγαλύτερη διαφορά ακραίων τιμών εμφανίζουν. Αντίθετα όσα βρίσκονται κοντά στο μέσο όρο, έχουν περισσότερο ομοιόμορφη ανάπτυξη. Γιατί σε αυτούς τους πληθυσμούς μυκήτων δεν έχουν ασκηθεί δραστικές πιέσεις ανάπτυξης.



Εικόνα 5.2.4. Αποτελέσματα 4^{ης} εβδομάδας

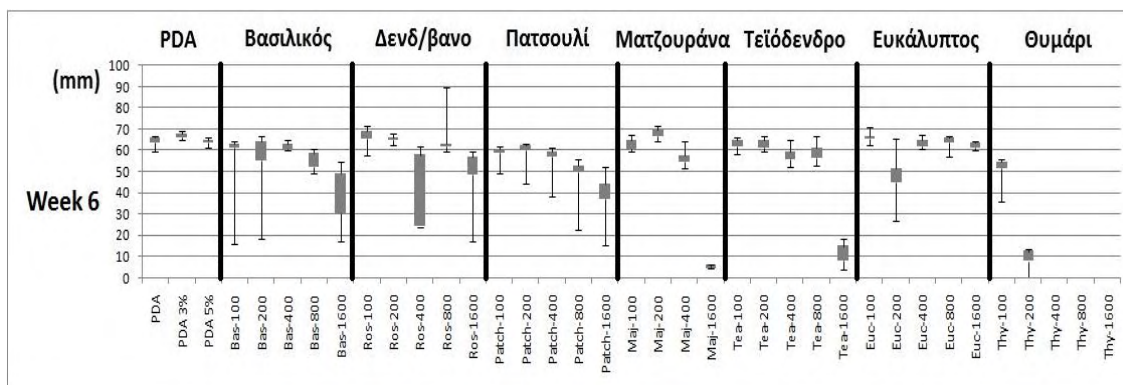
Στην 5η εβδομάδα (Εικ.5.2.5.) το ίδιο μοτίβο ανάπτυξης συνεχίστηκε για όλες τις συγκεντρώσεις αιθέριων ελαίων. Ενώ γίνεται ξεκάθαρο πλέον πως οι συγκεντρώσεις σε έλαιο ματζουράνας και τειόδενδρου στα 1600 ppm καθώς και του θυμαριού στα 200 ppm ήταν κατασταλτικές αλλά όχι ανασταλτικές για την ανάπτυξη του μύκητα. Με άλλα λόγια καθυστερούν την ανάπτυξη του αλλά δεν τον σκοτώνουν.



Εικόνα 5.2.5. Αποτελέσματα 5^{ης} εβδομάδας

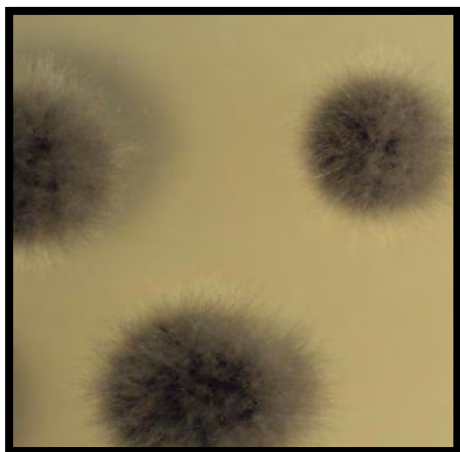
Συμπερασματικά στο τέλος του πειράματος την 6^η εβδομάδα (Εικ.5.2.6.) μπορούμε να πούμε πως τη καλύτερη αποτελεσματικότητα τη παρουσίασε το θυμάρι με τιμή ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (Minimum Inhibitory Concentration)(MIC) τα 400 ppm.

Σε ότι αφορά τα αιθέρια έλαια, παρατηρήθηκαν περιπτώσεις συγκεντρώσεων κατά τις οποίες όχι μόνο δεν περιορίστηκε η ανάπτυξη του μύκητα αλλά εμφάνισαν δυναμική ανάλογη με εκείνη του μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, τα αιθερια έλαια Ευκάλυπτος (100 ppm), Δενδρολίβανο (100 µg/ml) και Ματζουράνα (200 ppm), δεν υπέδειξαν σημαντική στατιστική διαφορά ως προς την ανάπτυξη τους συγκριτικά με τον μάρτυρα (PDA 3%)(One Way ANOVA, $P=0,207<0,05$), δηλαδή τα συγκεκριμένα αιθέρια έλαια όχι μόνο δε καταστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα αλλά υποβοηθούν σημαντικά το μύκητα να αναπτυχθεί. Η ματζουράνα (200 ppm) επιπρόσθετα, αν και χωρίς σημαντικές στατιστικές διαφορές ($P=0,178<0,05$), εμφάνισε αυξημένη Μέση Διάμετρο Ανάπτυξης έναντι του PDA 3%.

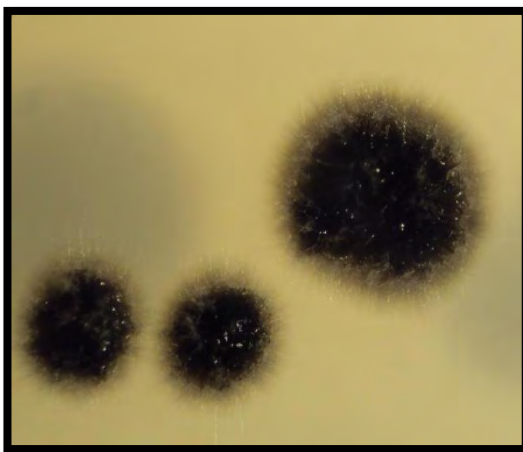


Εικόνα 5.2.5. Αποτελέσματα 5^{ης} εβδομάδας

Όπως μόλις είπαμε, την καλύτερη αποτελεσματικότητα τη παρουσίασε το θυμάρι με MIC τα 400 ppm, ενώ ακόμη και σε συγκεντρώσεις κάτω από το MIC παρατηρήθηκαν μεταβολές ως προς την ικανότητα του μύκητα να παράγει μελανίνη στο τοίχωμα των μυκελίων του, προκαλώντας και μορφολογικές μεταβολές στη δομή του μύκητα. Στις δύο εικόνες βλέπετε ακριβώς αυτό.



Εικόνα 5.2.7. Θυμάρι 200ppm



Εικόνα 5.2.8. PDA (3% NaCl)

Παρατηρήστε τη μορφολογία των υφών της αποικίας του μύκητα στην δράση του θυμαριού (Εικ.5.2.7.) και συγκρίνετε την με τον μάρτυρα (Εικ.5.2.8.).

Επομένως, θα μπορούσαμε να καταλήξουμε συμπερασματικά πως μέσα από αυτή τη πειραματική εργασία προέκυψε ότι:

- Το αιθέριο έλαιο θυμαριού είναι ένας ισχυρός παράγοντας καταστολής ανάπτυξης του μύκητα του γένους *Exophiala*
- Το αιθέριο έλαιο ευκαλύπτου και δενδρολίβανου δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα παρά τη γνωστή αντιμυκητιακή τους δράση.
- Το αιθέριο έλαιο Ματζουράνας (200ppm) προάγει την ανάπτυξη του μύκητα.
- Όλα τα αιθέρια έλαια πλην του θυμαριού είχαν ελάχιστη έως καθόλου ανασταλτική δράση έναντι του μύκητα και καθόλου κατασταλτική ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις.
- Η in vivo θεραπευτική εφαρμογή αιθέριου ελαίου θυμαριού αποτελεί μια ρεαλιστική λύση σε οικονομικό επίπεδο, η οποία όμως θα πρέπει να εφαρμοστεί και στη πράξη.

5.3. Συζήτηση

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως το αιθέριο έλαιο θυμαριού είναι ένα ικανό εργαλείο θεραπευτικής αντιμετώπισης έναντι των μολύνσεων των εκτρεφόμενων ψαριών από *Exophiala*, καθώς 1) η εφαρμογή μπορεί να γίνει στη τροφή, 2) είναι ασφαλές και 3) δεν προβλέπονται χρόνοι αναμονής έως την κατανάλωση. Επίσης τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν και για την αντιμετώπιση επιδερμικών μολύνσεων από *Exophiala* σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με απευθείας εφαρμογή του ελαίου στο δέρμα.

Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί μια στροφή του καταναλωτικού κοινού προς τα προϊόντα ομορφιάς και περιποίησης που περιέχουν φυσικά φυτικά συστατικά. Η αύξηση των πωλήσεων αυτών των προϊόντων είναι αποτέλεσμα της ευαισθητοποίησης της καταναλωτικής συνείδησης των πολιτών σε ότι αφορά το περιβάλλον και τη σχέση που θέλουν οι ίδιοι να διατηρήσουν με αυτό. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η ραγδαία αύξηση προϊόντων που περιέχουν είτε ως βάση είτε συμπληρωματικά, αιθέρια έλαια από βότανα και αρωματικά φυτά. Όμως, παράλληλα αναπτύσσονται και ακραίες πεποιθήσεις σε ότι αφορά τη θεραπευτική ικανότητα των βοτάνων και των αρωματικών φυτών, και ιδιαίτερα έναντι δερματικών μυκητιάσεων και μυκητιάσεων νυχιών σε ανθρώπους. Αυτή η εργασία καταδεικνύει ακριβώς πως συγκεκριμένα βότανα και αρωματικά φυτά έχουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίζουν συγκεκριμένους μολυσματικούς παράγοντες και σε καμία περίπτωση δε θα πρέπει να θεωρούνται πανάκεια. Με άλλα λόγια, ένα φυτικό αιθέριο έλαιο μπορεί να είναι ανασταλτικός παράγοντας έναντι ενός μολυσματικού παράγοντα αλλά ταυτόχρονα να είναι προαγωγικός παράγοντας για την ανάπτυξη κάποιου άλλου. Επομένως η χρήση των αιθέριων ελαίων πρέπει να είναι συγκεκριμένη και να προκύπτει μέσα από τεκμηριωμένα αποτελέσματα έρευνας.

Σε ότι αφορά βακτηριακούς μολυσματικούς παράγοντες των ψαριών έχει αποδειχθεί *in vitro* πως η ανάπτυξη του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (ένα ιδιαίτερα μολυσματικό παθογόνο των ψαριών), αναστέλλεται αποτελεσματικά από το αιθέριο έλαιο λεβάντας της στενόφυλλης *Lavandula angustifolia* (*L. officinalis*), ενώ δεν καταστέλλεται καθόλου από το αιθέριο έλαιο της ισλανδικής λειχήνας *Cetraria islandica*.

Σε ότι αφορά την ανάπτυξη του *Yersinia ruckeri* επίσης η λεβάντα έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του παθογόνου όμως τα αιθέρια έλαια της ιππουρίδας των αγρών *Equisetum arvense* και του κόκκινου μυρτίλου *Vaccinium vitis-idaea* δε την

κατέστειλαν καθόλου. Η ανάπτυξη του είδους *Lactococcus garvieae* καταστέλλεται *in vitro* από το αιθέριο έλαιο ρίγανης *Oreganum vulgare* αλλά δεν καταστέλλεται καθόλου από το θυμάρι *Thymus vulgaris* (Bulfon *et al.*, 2014), το οποίο στη παρούσα εργασία κατέδειξε τη σαφέστερη κατασταλτική δράση έναντι του μύκητα του γένους *Exophiala*, ενώ γενικότερα η αντιμυκητιακή δράση του θυμαριού έχει αναφερθεί σε πολλές εργασίες (Onaran *et al.*, 2014). Τέλος για τα είδη *Listonella anguillarum* και *Vibrio alginolyticus* φαίνεται πως εκχύλισμα από φυτά του γένους *Angelica* φαίνεται πως δρουν κατασταλτικά ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Athanassopoulou *et al.*, 2000).

Θεωρείται αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση δραστηριότητας έναντι του μύκητα του γένους *Exophiala* από περισσότερα αιθέρια έλαια και πιο συγκεκριμένα από εκείνα της κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum*), του γαρύφαλλου (*Eygenia caryophyllata*), της Βοσβελίας της Ιερής (*Boswellia carterii*), της πιπερόριζας (*Zingiber officinale*), του γερανιού (*pelargonium graveolens*), της λεβάντας (*Lavandula angustifolia*) και της ρίγανης (*Oreganum vulgare*) τα οποία φαίνεται πως περιέχουν ισχυρούς αντιμυκητιακούς παράγοντες.

Εφόσον καθοριστούν οι κατασταλτικές συγκεντρώσεις των βοτάνων και των αρωματικών φυτών θα πρέπει να γίνει και ένας *in vivo* έλεγχος δραστηριότητας αυτών των αιθέριων ελαίων μετά από πειραματικές μολύνσεις, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η θεραπευτική δράση.

5.4. Τελικά συμπεράσματα

- Το αιθέριο έλαιο θυμαριού είναι ένας ισχυρός παράγοντας καταστολής ανάπτυξης του μύκητα του γένους *Exophiala*
- Το αιθέριο έλαιο ευκαλύπτου και δενδρολίβανου δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα παρά τη γνωστή αντιμυκητιακή τους δράση.
- Το αιθέριο έλαιο Ματζουράνας (200ppm) προάγει την ανάπτυξη του μύκητα.
- Όλα τα αιθέρια έλαια πλην του θυμαριού είχαν ελάχιστη έως καθόλου ανασταλτική δράση έναντι του μύκητα και καθόλου κατασταλτική ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις.

- Η in vivo θεραπευτική εφαρμογή αιθέριου ελαίου θυμαριού αποτελεί μια ρεαλιστική λύση σε οικονομικό επίπεδο, η οποία όμως θα πρέπει να εφαρμοστεί και στη πράξη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Sater, M. A., Abdel-Hadi, A. M., Abdul-Raouf, U. M., & AS, F.** (2016). Pathogenicity of *Exophiala xenobiotica* isolated from infected Crocodile fish for Rabbit fish *Siganus rivulatus* (Forsskal, 1775).
- Arvanitidou, M., Kanellou, K., Constantinides, T. C., & Katsouyannopoulos, V.** (1999). The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2): 81-84.
- Athanassopoulou F., Kotou E., Watsos E., Giagnisi M.** (2000) Study of the bacteriostatic activity of an Artemia enrichment compound based on plant extracts from *Angelica* sp (In Greek). *Biologia Gallohellenica* 51 (4): 293-296.
- Athanassopoulou F., Haralabidis S., Bourtzi- Hatzopoulou E..** (1986) Parasites and fungi of *Scomber japonicus colias* Gmelin 1789 from the North Aegean Sea. *Biologia Gallohellenica* 12: 217-228
- Babič, M. N., Zalar, P., Ženko, B., Džeroski, S., & Gunde-Cimerman, N.** (2016). Yeasts and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. *Fungal Ecology*, 20, 30-39.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.** (2008) Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol* 46:446-475.
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S.** (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12), 2166-2174.
- Benth.:** an aromatic medicinal plant of industrial importance." *Molecules* 20.5 (2015): 8521-8547.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E.** (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia*

officinalis L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(19), 7879-7885.

Bulfon, C., Volpatti, D., & Galeotti, M. (2014). In vitro antibacterial activity of plant ethanolic extracts against fish pathogens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(5), 545-557. doi:10.1111/jwas.12151

Busatta, C., Vidal, R. S., Popiolski, A. S., Mossi, A. J., Dariva, C., Rodrigues, M. R. A., ... & Cansian, R. L. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food microbiology*, 25(1), 207-211.

Calvo, E., Pastor, F. J., & Guarro, J. (2010). Antifungal therapies in murine disseminated *phaeohyphomycoses* caused by *Exophiala* species. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(7), 1455-1459.

Camus, A., Berliner, A., Hyatt, M., Hatcher, N., & Clauss, T. (2015). *Exophiala xenobiotica* aerocystitis in a Queensland grouper *Epinephelus lanceolatus* (Bloch). *Journal of fish diseases*, 38(2), 221-225.

Carson, C. F., K. A. Hammer, and T. V. Riley. "*Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties." *Clinical microbiology reviews* 19.1 (2006): 50-62.

De Hoog, G. S., Vicente, V. A., Najafzadeh, M. J., Harrak, M. J., Badali, H., & Seyedmousavi, S. (2011). Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 27, 46.

Fukai, T., Hiruma, M., Ogawa, Y., Ikeda, S., Ikeda, H., Sano, A., & Makimura, K. (2013). A case of *phaeohyphomycosis* caused by *Exophiala oligosperma* successfully treated with local hyperthermia. *Medical mycology journal*, 54(3), 297-301.

Ghalem, B. R., & Mohamed, B. (2008). Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African journal of Pharmacy and pharmacology*, 2(10), 211-215.

Gjessing, M. C., Davey, M., Kvellestad, A., & Vrålstad, T. (2011). *Exophiala angulospora* causes systemic inflammation in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Diseases of aquatic organisms*, 96(3), 209-219.

Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V. (2003). Antifungal activities of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of applied Microbiology*, 95, 853-860.

Hargreaves, L.L., Jarvis, B., Rawlinson, A.P. and Wood, J.M. (1975). The antimicrobial effects of spices, herbs and extracts from these and other food plants. The British Food Manufacturing Industries Research Association Scientific and Technical Surveys. 88.

Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, 108(3), 986-995.

Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.-J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.-J., Zu, Y.-G., Liu, X.-L. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosemary*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 63-68.

Johnson, J.J. 2011. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters*. 305, 1-7. Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K. G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.

Jyliani H.R. and J.E. Simon 2002. Antioxidant activity of *basil*. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. p. 575 – 579.

Kan, T., Takahagi, S., Kamegashira, A., Ooiwa, H., Yaguchi, T., & Hide, M. (2013). Disseminated *subcutaneous phaeohyphomycosis* caused by *Exophiala oligosperma* in a patient with Wegener's granulomatosis. *Acta dermato-venereologica*, 93(3), 356-357.

Kolygas N. Markos, Evgenia Gourzioti, Foteini Athanasopoulou (2013): First incident of mycosis in marine cultured red porgy (*Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758) caused by *Exophiala* sp. in Greece. 15^o Hellenic conference of ichthyology. 379-382.

Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C. S., & Dubey, N. K. (2008). Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 575-580.

Leeja, L., and J. E. Thoppil. "Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L.(Sweet marjoram)." *Journal of Environmental Biology* 28.1 (2007): 145.

Lo Schiavo, A., Gambardella, A., & Caccavale, S. (2013). Fungal *melanonychia* and *Exophiala dermatitidis*. *Mycoses*, 56(2), 187-188.

Marancik, D. P., Berliner, A. L., Cavin, J. M., Clauss, T. M., Dove, A. D., Sutton, D. A., ... & Camus, A. C. (2011). Disseminated fungal infection in two species of captive sharks. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42(4), 686-693.

Mari M, Bertolini P, Pratella GC. (2003) Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *J Appl Microbiol* 94:761-766.

Miura, Kayoko, Hiroe Kikuzaki, and Nobuji Nakatani. "Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method." *Journal of agricultural and food chemistry* 50.7 (2002): 1845-1851.

Miyazawa, M., Okuno, Y., Nakamura, S. I., & Kosaka, H. (2000). Antimutagenic activity of flavonoids from *Pogostemon cablin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 642-647.

Mok, W. Y., Castelo, F. P., & Barreto da Silva, M. S. (1981). Occurrence of *Exophiala werneckii* on salted freshwater fish *Osteoglossum bicirrhosum*. *International Journal of Food Science & Technology*, 16(5), 505-512.

Munchan, C., Kurata, O., Wada, S., Hatai, K., Sano, A., Kamei, K., & Nakaoka, N. (2009). *Exophiala xenobiotica* infection in cultured striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider), in Japan. *Journal of fish diseases*, 32(10), 893-900.

Murugan, R., and C. Livingstone. "Origin of the name 'patchouli' and its history." *Curr. Sci* 99 (2010): 1274-1276.

Najafzadeh, M. J., Suh, M. K., Lee, M. H., Ha, G. Y., Kim, J. R., Kim, T. H., ... & De Hoog, G. S. (2013). *Subcutaneous phaeohyphomycosis* caused by *Exophiala equina*, with susceptibility to eight antifungal drugs. *Journal of medical microbiology*, 62(5), 797-800.

Onaran, A., Yilar, M., Belguzar, S., Bayan, Y., & Aksit, H. (2014). Antifungal and bioherbicidal properties of essential oils of thymus fallax fish & mey., origanum vulgare L. and mentha dumetorum schult. *Asian Journal of Chemistry*, 26(16), 5159-5164. doi:10.14233/ajchem.2014.16582

Otis, E. J., Wolke, R. E., & Blazer, V. S. (1985). Infection of *Exophiala salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Wildlife Diseases*, 21(1), 61-64.

Overy, D. P., Groman, D., Giles, J., Duffy, S., Rommens, M., & Johnson, G. (2015). *Exophiala angulospora* causes systemic mycosis in Atlantic Halibut: A case report. *Journal of aquatic animal health*, 27(1), 12-19.

Pattanaprichakul, P., Bunyaratavej, S., Leeyaphan, C., Sitthinamsuwan, P., Sudhadham, M., Muanprasart, C., ... & de Hoog, G. S. (2013). An unusual case of eumycetoma caused by *Exophiala jeanselmei* after a sea urchin injury. *Mycoses*, 56(4), 491-494.

Pedersen, O. A., & Langvad, F. (1989). *Exophiala psychrophila* sp. nov., a pathogenic species of the black yeasts isolated from farmed Atlantic salmon. *Mycological research*, 92(2), 153-156.

Peter K.V., 2001, Handbook of herbs and spices, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.

Porteous, N. B., Grooters, A. M., Redding, S. W., Thompson, E. H., Rinaldi, M. G., De Hoog, G. S., & Sutton, D. A. (2003). Identification of *Exophiala mesophila* isolated from treated dental unit waterlines. *Journal of clinical microbiology*, 41(8), 3885-3889.

Řehulka, J., Kolařík, M., & Hubka, V. (2017). Disseminated infection due to *Exophiala pisciphila* in Cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*. *Journal of fish diseases*, 40(8), 1015-1024.

Richards, R. H., Holliman, A., & Helgason, S. (1978). *Exophiala salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 1(4), 357-368.

Sav, H., Ozakkas, F., Altınbas, R., Kiraz, N., Tümgör, A., Gümral, R., ... & Hoog, G. S. (2016). Virulence markers of opportunistic black yeast in *Exophiala*. *Mycoses*, 59(6), 343-350.

Swamy, Mallappa Kumara, and Uma Rani Sinniah. "A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin*.

Tokuhisa, Y., Hagiya, Y., Hiruma, M., & Nishimura, K. (2011). *Phaeohyphomycosis* of the face caused by *Exophiala oligosperma*. *Mycoses*, 54(4).

Uijthof, J. M. J., Figge, M. J., & De Hoog, G. S. (1997). Molecular and physiological investigations of *Exophiala* species described from fish. *Systematic and applied microbiology*, 20(4), 585-594.

Vernet, Ph, R. H. Gouyon, and G. Valdeyron. (1986). "Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L: a case of polymorphism in a biosynthetic chain." *Genetica* 69.3: 227-231.

Vilela, G. R., de Almeida, G. S., D'Arce, M. A. B. R., Moraes, M. H. D., Brito, J. O., da Silva, M. F. D. G., ... & da Gloria, E. M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*, 45(2), 108-111.

Waliwitiya, R., Kennedy, C.J., Lowenberger, C.A. 2009. Larvicidal and ovipositionaltering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 65 (3), 241248.

Wang, L., She, X., Lv, G., Shen, Y., Cai, Q., Zeng, R., ... & Li, M. (2013). Cutaneous and mucosal *phaeohyphomycosis* caused by *Exophiala spinifera* in a pregnant patient: case report and literature review. *Mycopathologia*, 175(3-4), 331-338.

Woo, P. C., Ngan, A. H., Tsang, C. C., Ling, I. W., Chan, J. F., Leung, S. Y., ... & Lau, S. K. (2013). Clinical spectrum of *Exophiala* infections and a novel *Exophiala* species, *Exophiala hongkongensis*. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), 260-267.

Yiagnisis M, Alexis M, Solomakos N, Bitchava K, Govaris A. (2008) Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on the intestinal microflora of sea bream *Sparus aurata*. Hellenic Congress for Productive Animals, Hygiene- Safety of foods of Animal Origin and Consumer Protection A36: 75-76

Yoon, Y. A., Park, K. S., Lee, J. H., Sung, K. S., Ki, C. S., & Lee, N. Y. (2012). *Subcutaneous phaeohyphomycosis* caused by *Exophiala salmonis*. *Annals of laboratory medicine*, 32(6), 438-441.

Zeng, J. S., & De Hoog, G. S. (2008). *Exophiala spinifera* and its allies: diagnostics from morphology to DNA barcoding. *Medical Mycology*, 46(3), 193-208.

Zeng, J. S., Sutton, D. A., Fothergill, A. W., Rinaldi, M. G., Harrak, M. J., & De Hoog, G. S. (2007). Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), 3713-3720.

Γκολιάρης Απ. 2002 «Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά» ΕΘΙΑΓΕ 10 (23) σελ. 5-8.

Καραφέρης Ι. (2013). Ουσίες φυσικής προέλευσης με αναισθητικές ιδιότητες. Μεταπτυχιακή διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 77 σελ.

Κατσιμπιρη Φ. (2010). Εγκλεισμός συστατικών αιθέριου ελαίου λεβάντας σε β-κυκλοδεξτρίνη. Μεταπτυχιακή εργασία, Γενικό Τμήμα Θετικών Επιστημών στη Γεωπονία, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 85 σελ.

Λίγγα Κων/να, (2000), Φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά της Ελλάδας, Αθήνα.

Μαυροκουκουλάκη Ζ. (2013). Μάρκετινγκ αρωματικών φυτών και αιθέριων ελαίων στην Κρήτη. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Εμπορίας και Διαφήμισης, Τ.Ε.Ι. Κρήτης, 98 σελ.

Μερτζανίδης Δ. (2015). Βιοποικιλότητα αρωματικών φυτών της ελληνικής χλωρίδας: Καταγραφή των αιθερίων ελαίων των *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* και *Thymus*. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 90 σελ.

Ξυδιά Γ. (2010). Η καλλιέργεια ρίγανης (*Origanum vulgare* L.) στην Ελλάδα. Πτυχιακή εργασία. Τμήμα φυτικής Παραγωγής, Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, 66 σελ.

Σκουρμπής Β. 1988. Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια εκδόσεις «ΜΕΛΙΣΣΑ» Θεσσαλονίκη.

Τζιμήκα Σ. (2013). Γραμμή Παραγωγής αιθέριων ελαίων από φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης, 60 σελ.

Τσάτσα Α.Γ. (2004). Επίδραση του επιπέδου αρδεύσεις και της εποχής συγκομιδής στο αιθέριο έλαιο του βασιλικού (*Ocimum basilicum* L.). Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού περιβάλλοντος. Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 86 σελ.

Τσιγαρίδα Α. (2007). Φαρμακευτικά φυτά και τοπική και περιφερειακή ανάπτυξη: η περίπτωση ενός μοντέλου τοπικής και περιφερειακής ανάπτυξης στο πλαίσιο της συμβολαϊκής γεωργίας στην Ελλάδα. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Τμήμα Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 325 σελ.

Τσιουρή Μ. (2015). Αποτελεσματικότητα φυσικών προϊόντων στην αντιμετώπιση ευαίσθητων και ανθεκτικών σε μυκητοκτόνα στελεχών *Alternaria alternata*. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 95 σελ.

Τσουβαλάκη Ε. (2009). Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά Κρήτης. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα φυτικής Παραγωγής, Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης, 104 σελ.

Φραντζεσκάκης Γ. Αρωματικά φυτά. Πτυχιακή εργασία, Τμήμα φυτικής Παραγωγής, Τ.Ε.Ι. Κρήτης, 55 σελ.

Internet:

<https://eclass.upatras.gr>

<https://el.wikipedia.org>

